

# Die funktionelle Charakterisierung des anaeroben Regulators Fnr und die Regulation der anaeroben Genexpression in *Bacillus subtilis*

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Ines Dorothee Gruner

aus Wolfenbüttel

1.Referent: Prof. Dr. Dieter Jahn

2.Referentin: Dr. Gunhild Layer

eingereicht am: 07.06.2010

mündliche Prüfung (Disputation) am: 22.07.2010

Druckjahr 2010

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

**Reents, H., I. Gruner, U. Harmening, L. H. Bottger, G. Layer, P. Heathcote, A. X. Trautwein, D. Jahn and E. Härtig, 2006.**

*Bacillus subtilis* Fnr senses oxygen via a [4Fe-4S] cluster coordinated by three cysteine residues without change in the oligomeric state.

*Mol. Microbiol.* **60**:1432–1445.

### **Tagungsbeiträge**

**Ines Gruner, Claudia Frädrich and Elisabeth Härtig**

Mutational analysis of the anaerobic regulator Fnr of *Bacillus subtilis*

Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte

Mikrobiologie (VAAM), 2008

**Ines Gruner, Claudia Frädrich and Elisabeth Härtig**

Characterisation of the anaerobic regulator Fnr of *Bacillus subtilis*

27<sup>th</sup> “Mechanisms of Gene Regulation” Symposium, 2008

**Ines Gruner, Heike Reents, Dieter Jahn and Elisabeth Härtig**

Mutational analysis of *Bacillus subtilis* FNR to identify the fourth ligand of the [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-cluster

4<sup>th</sup> Conference on Functional Genomics of Gram-Positive Microorganisms/14<sup>th</sup>

International Conference on Bacilli, Italy 2007

**Ines Gruner, Heike Reents and Elisabeth Härtig**

Functional Characterization of the [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-cluster of *Bacillus subtilis* Fnr

26<sup>th</sup> “Mechanisms of Gene Regulation” Symposium, 2007

**Ines Gruner, Anika March, Heike Reents and Elisabeth Härtig**

Adaptation of *Bacillus subtilis* to anaerobic growth condition

Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte

Mikrobiologie (VAAM), 2007

**Ines Gruner, Heike Reents, Ute Harmening and Elisabeth Härtig**

Functional characterization of the [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-cluster of *Bacillus subtilis* Fnr

Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte

Mikrobiologie (VAAM), 2005

...meiner Familie...

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Einleitung.....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 <i>Bacillus subtilis</i> als Gram-positiver Modellorganismus .....   | 1         |
| 1.2 Der anaerobe Energiestoffwechsel von <i>Bacillus subtilis</i> .....  | 1         |
| 1.3 Die Regulation der Anaerobiose in <i>Bacillus subtilis</i> .....   | 4         |
| 1.4 Das Fnr-Regulon in <i>Bacillus subtilis</i> .....  | 6         |
| 1.5. Die Spezifität der DNA-Bindung des FnrS aus <i>Bacillus subtilis</i> .....                                | 9         |
| 1.6 Die familiäre Einordnung des Redoxregulators Fnr aus <i>Bacillus subtilis</i> .....                        | 11        |
| 1.7 Das Eisen-Schwefel-Zentrum als proteinogener Kofaktor .....  | 13        |
| 1.8 Das DNA-Bindemotiv von Regulatoren der Crp/Fnr-Familie .....   | 15        |
| 1.9 Die Transaktivierung der Regulatoren der Crp/Fnr-Familie .....   | 17        |
| <b>2. Zielsetzung .....</b>  | <b>21</b> |
| <b>3. Material und Methoden .....</b>  | <b>22</b> |
| 3.1 Abkürzungsverzeichnis.....   | 22        |
| 3.2 Geräte .....   | 23        |
| 3.3 Chemikalien.....   | 25        |
| 3.4 Kommerzielle Kits und Enzyme .....   | 25        |
| 3.4.1 Kommerzielle Kits .....  | 25        |
| 3.4.2 Kommerzielle Enzyme .....  | 25        |
| 3.5 Primer und Oligonukleotide .....   | 26        |
| 3.6 Bakterienstämme und Vektoren .....   | 31        |
| 3.7 Mikrobiologische Techniken .....   | 37        |
| 3.7.1 Sterilisation .....  | 37        |
| 3.7.2 Bakterienkultivierung auf Agarplatten .....  | 37        |
| 3.7.3 Wachstumsbedingungen für <i>Bacillus subtilis</i> und <i>Escherichia coli</i> ...                        | 37        |
| 3.7.4 Antibiotika .....  | 39        |
| 3.7.5 Bestimmung der Zelldichte .....  | 39        |
| 3.7.6 Anlegen von Glycerinkulturen .....   | 40        |
| 3.7.7 Test für die Integration in den <i>amyE</i> -Genlocus.....   | 40        |
| 3.7.8 Test auf Aktivität des FnrS <i>in vivo</i> in <i>Bacillus subtilis</i> durch<br>blau weiß Selektion..... | 40        |
| 3.8. Molekularbiologische Techniken .....  | 41        |
| 3.8.1 Herstellung kompetenter <i>Bacillus subtilis</i> Zellen.....   | 41        |
| 3.8.2 Transformation von <i>Bacillus subtilis</i> mit chromosomaler und<br>Plasmid-DNA .....                   | 42        |

|  |    |
|--|----|
| 3.8.3 Herstellung elektrokompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen.....   | 42 |
| 3.8.4 Transformation von <i>Escherichia coli</i> mittels Elektroporation.....  | 43 |
| 3.8.5 Herstellung chemokompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen.....   | 43 |
| 3.8.6 Transformation von <i>Escherichia coli</i> mittels Chemotransformation...  | 44 |
| 3.8.7 Plasmid-Präparation .....  | 44 |
| 3.8.8 Präparation chromosomaler <i>Bacillus subtilis</i> DNA .....   | 45 |
| 3.8.9 Bestimmung der Konzentration von DNA Lösungen.....   | 46 |
| 3.8.10 Polymerase-Kettenreaktion zur DNA-Amplifikation.....  | 46 |
| 3.8.11 Spalten von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....  | 47 |
| 3.8.12 Dephosphorylierung von DNA-Enden .....  | 47 |
| 3.8.13 Aufreinigung von DNA-Fragmenten .....   | 48 |
| 3.8.14 Ligation von DNA.....   | 48 |
| 3.8.15 Annealing von Oligonukleotiden.....   | 48 |
| 3.8.16 Ortsgerichtete Mutagenese.....  | 49 |
| 3.8.17 DNA-Gelelektrophorese.....  | 50 |
| 3.8.18 DNA-Sequenzbestimmung .....   | 51 |
| 3.8.19 Konstruktion von Plasmiden zur Komplementation einer<br><i>Bacillus subtilis fnr</i> -Mutante.....  | 53 |
| 3.8.20 Konstruktion von Plasmiden zur rekombinaten Darstellung<br>von Fnr aus <i>Bacillus subtilis</i> .....                                     | 53 |
| 3.8.21 Konstruktion von Plasmiden zur rekombinaten Darstellung von<br>FnrCCCC aus <i>Geobacillus stearothermophilus</i> .....                    | 55 |
| 3.8.22 Konstruktion von Plasmiden zur rekombinaten Darstellung<br>von ResD und ResE aus <i>Bacillus subtilis</i> .....                           | 55 |
| 3.8.23 Konstruktion von Plasmiden für die ChAP Analyse.....  | 56 |
| 3.8.24 Konstruktion von Plasmiden für die <i>in vivo</i> Bindungsstudien .....   | 56 |
| 3.8.25 Herstellung von <i>Bacillus subtilis</i> Stämmen zum Test von<br>Reporterfusionen.....  | 57 |
| 3.8.26 Herstellung von <i>Bacillus subtilis</i> Stämmen für<br>die ChAP Analysen .....   | 58 |
| 3.8.27 Herstellung von <i>Bacillus subtilis</i> Stämmen zur Untersuchung<br>modifizierter <i>narK</i> - und <i>ywcJ</i> -Promotorfragmente ..... | 58 |
| 3.9 Biochemische Techniken.....  | 59 |
| 3.9.1 Anaerobisieren von Lösungen .....  | 59 |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.9.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....   | 59        |
| 3.9.3 Westernblot.....  | 61        |
| 3.9.4 Proteinproduktionstest und Probenaufbereitung für die<br>diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ..... | 63        |
| 3.9.5 Denaturierende Polyacrylamidgele zur Trennung von RNA-<br>Fragmenten für <i>in vitro</i> Transkriptions Analysen..... | 64        |
| 3.9.6 Heterologe Produktion- und Reinigung von <i>Bacillus subtilis</i> Fnr<br>über einen Strep-Affinitätstag .....         | 64        |
| 3.9.7 Heterologe Proteinproduktion und Reinigung von <i>Geobacillus</i><br><i>stearothermophilus</i> FnrCCCC.....           | 66        |
| 3.9.8 Heterologe Produktion und Reinigung von <i>Bacillus subtilis</i><br>ResD/E .....                                      | 67        |
| 3.9.9 Heterologe Produktion von <i>Bacillus subtilis</i> RNAP<br>in <i>Bacillus subtilis</i> .....                          | 68        |
| 3.9.10 Konzentrieren von Proteinlösungen .....  | 70        |
| 3.9.11 Dialyse von Proteinlösungen.....   | 70        |
| 3.9.12 Proteinbestimmung .....  | 71        |
| 3.9.13 Eisenbestimmung .....  | 71        |
| 3.9.14 UV-VIS Absorptionsspektroskopie .....  | 71        |
| 3.9.15 $\beta$ -Galaktosidase Enzymtest .....   | 71        |
| 3.9.16 Analytische Gelpermeationschromatographie (GPC) .....  | 73        |
| 3.9.17 Präparative Gelpermeationschromatographie (GPC) .....  | 73        |
| 3.9.18 Kristallisation.....   | 74        |
| 3.9.19 Protein-Oligonukleotid Kokristallisation.....  | 75        |
| 3.9.20 <i>in vitro</i> Transkription.....   | 75        |
| 3.9.21 DNaseI Footprint Analyse .....   | 76        |
| 3.9.22 Chromatin affinity purification (ChAP).....  | 77        |
| 3.9.23 Zellaufschluss durch FastPrep®-24.....   | 79        |
| 3.9.24 Ultraschallbehandlung zum Fragmentieren von<br>quervernetzter DNA .....  | 79        |
| 3.9.25 Mößbauerspektroskopie mit gereinigtem Protein.....   | 79        |
| 3.9.25.1 Herstellung einer $^{57}\text{FeCl}_3$ -Lösung.....  | 81        |
| 3.9.26 Mößbauerspektroskopie mit ganzen Zellen .....  | 81        |
| <b>4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>   | <b>83</b> |

---

|  |     |
|--|-----|
| 4.1 Die biochemische Charakterisierung des Regulators Fnr<br>aus <i>Bacillus subtilis</i> .....  | 83  |
| 4.1.1. Die Koordination des $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums des<br><i>Bacillus subtilis</i> Fnrs .....                                | 83  |
| 4.1.2 Die Rolle der Aspartatreste des <i>Bacillus subtilis</i> Fnrs für die<br>Koordination des $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums ..... | 88  |
| 4.1.2.1 Die Fnr-Aspartatmutante D141A komplementiert nicht das<br>inaktivierte chromosomale <i>fnr</i> -Gen.....                       | 90  |
| 4.1.2.2 Spektroskopische Untersuchungen von Fnr-Aspartatmutanten .   | 92  |
| 4.1.3 DNA-Bindungsstudien mit Fnr Proteinen .....  | 94  |
| 4.1.4 Das Mutantenprotein FnrD141C komplementiert das inaktivierte<br>chromosomale <i>fnr</i> -Gen .....                               | 96  |
| 4.1.5 Koordination eines $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums durch die Fnr-Mutante<br>D141C.....  | 97  |
| 4.1.6 Die Fnr-Mutante D141C koordiniert ein neuartiges $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -<br>Zentrum .....                                       | 99  |
| 4.1.7 Die Bindung des <i>Bacillus subtilis</i> Fnrs an DNA.....  | 104 |
| 4.1.8 Die konservierte Domäne des <i>Bacillus subtilis</i> Fnr .....   | 109 |
| 4.1.9 Die Interaktion des <i>Bacillus subtilis</i> Fnrs über die AR3 mit der<br>RNA Polymerase .....                                   | 115 |
| 4.1.10 Modell des Aktivierungsmechanismus des Fnrs aus<br><i>Bacillus subtilis</i> .....   | 121 |
| 4.1.11 Experimente zur Kristallisation des <i>Bacillus subtilis</i> Fnrs.....  | 125 |
| 4.2.1 Etablierung eines Expressionssystem zur Produktin des<br>FnrCCCC aus <i>Geobacillus stearothermophilus</i> .....                 | 130 |
| 4.2.2 Etablierung einer chromatographischen Reinigung des Strep-<br>FnrCCCC aus <i>Geobacillus stearothermophilus</i> .....            | 133 |
| 4.2.2.1 Spektroskopische Untersuchungen des FnrCCCC aus<br><i>Geobacillus stearothermophilus</i> .....                                 | 135 |
| 4.2.3 Das FnrCCCC aus <i>Geobacillus stearothermophilus</i> bindet<br>an den <i>narG</i> -Promotor aus <i>Bacillus subtilis</i> . .... | 140 |
| 4.2.4 Experimente zur Kristallisation des <i>Geobacillus stearothermophilus</i><br>Fnrs.....   | 144 |
| 4.2.5 Experimente zur Kokristallisation von FnrCCCC-DNA-Komplexen.   | 147 |



|   |            |
|---|------------|
| 4.3.1 Footprint-Analysen mit dem Fnr aus <i>B. subtilis</i> für die<br>Promotoren der Gene der Gengruppe 1 und 2 des Fnr Regulons ..                | 149        |
| 4.3.2 <i>In vivo</i> Bindungsstudien der Regulatoren Rex und Fnr aus<br><i>Bacillus subtilis</i> an den <i>nark</i> und <i>ywcJ</i> -Promotor ..... | 154        |
| 4.3.3 Produktion und Reinigung der Proteine ResD und ResE aus<br><i>Bacillus subtilis</i> .....   | 160        |
| 4.3.4 Etablierung einer Analysenmethode zur Untersuchung der<br>Protein-DNA-Bindung <i>in vivo</i> .....  | 162        |
| 4.3.4.1 Prinzip der Chromatin-Affinitätsreinigung .....   | 162        |
| 4.3.4.2 Heterologe Produktion von <i>Bacillus subtilis</i> Strep-Fnr und<br>Rex-Strep .....   | 165        |
| 4.3.4.3 Reinigung von Strep-Fnr-DNA-Komplexen<br>aus <i>Bacillus subtilis</i> .....   | 167        |
| <b>5. Zusammenfassung .....</b>   | <b>173</b> |
| <b>6. Ausblick.....</b>   | <b>175</b> |
| <b>8. Anhang.....</b>   | <b>188</b> |
| <b>9. Danksagung .....</b>  | <b>189</b> |

# 1. Einleitung

## 1.1 *Bacillus subtilis* als Gram-positiver Modellorganismus

1835 wurde *Bacillus subtilis* erstmals von Ehrenberg als *Vibrio subtilis* beschrieben und war damit eines der ersten systematisch klassifizierten Bakterien. Etwa 30 Jahre später, wurde der Organismus durch Cohn in *B. subtilis* umbenannt. *B. subtilis*, der gemeine Heubacillus, ist ubiquitär verbreitet und kann aus Wasser, Luft und Boden isoliert werden. Die ca. zwei Mikrometer langen, stäbchenförmigen Zellen sind peritrich begeißelt. Das Gram-positive Bakterium gehört zur Familie der *Bacillaceae*, die die Fähigkeit haben, Endosporen zu bilden. Diese sind sehr resistent gegenüber äußeren Einflüssen wie z. B. Hitze und Chemikalien, was einen hervorragenden Schutz gegen widrige Umwelteinflüsse darstellt (Claus, 1986).

*B. subtilis* besiedelt sowohl die Rhizosphäre als auch die obere Bodenschicht und ernährt sich chemoorganotroph. Er hat aufgrund seiner saprophytischen Lebensweise Anteil an der Mobilisierung und Mineralisierung organischer Stoffe und deren Rückführung in die Nahrungskreisläufe. Als Kohlenstoff- und Energiequelle wird in erster Präferenz Glukose genutzt. Zur Energiegewinnung dient Sauerstoff als bevorzugter terminaler Elektronenakzeptor. Unter anaeroben Bedingungen können die Zellen bei Anwesenheit von Glukose- und Nitrat noch genügend Energie für ein verlangsamtes Wachstum durch Nitratatmung erzeugen (Claus, 1986; Cruz-Ramos *et al.*, 2000).

Aufgrund der Fähigkeit zur Sekretion extrazellulärer Enzyme wird *B. subtilis* insbesondere für die Herstellung von Waschmittelenzymen, aber auch für die Synthese von Riboflavin in der biotechnologischen Industrie genutzt. *B. subtilis* ist daher sowohl für die Grundlagenforschung, als auch für industrielle Zwecke ein interessanter Modellorganismus.

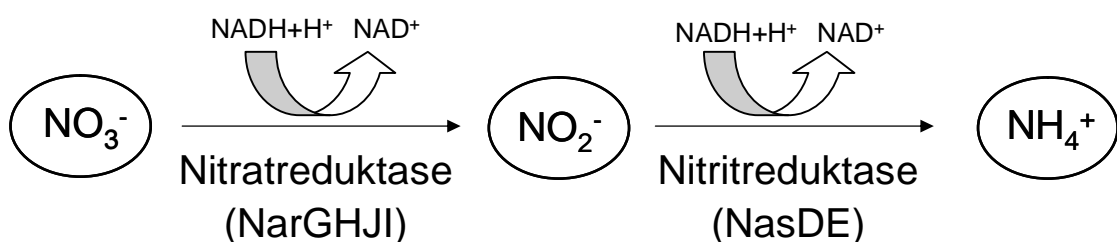
## 1.2 Der anaerobe Energiestoffwechsel von *Bacillus subtilis*

Lange Zeit galt *B. subtilis* als ein strikter Aerobier. Erst ungefähr 150 Jahre nach Klassifikation von *B. subtilis*, im Jahr 1993, wurde erstmals fakultativ anaerobes Wachstum von *B. subtilis* beschrieben (Priest, 1993). Dieses weckte das

Interesse mehrerer Wissenschaftler, das anaerobe Leben von *B. subtilis* zu erforschen z. B. (Cruz-Ramos *et al.*, 2000; Glaser *et al.*, 1995; Hartig *et al.*, 2004; Nakano *et al.*, 1997). Besonders nach Annotierung des Genoms von *B. subtilis* 1997 (Kunst and R. A. Daniel, 1998; Moszer *et al.*, 1995) konnten Gene in *B. subtilis* identifiziert werden, die Homologien aufwiesen zu bekannten Genen, von *E. coli*, die dort während der Anaerobiose wichtig sind. Dazu gehört unter anderem das *narGHJI*-Operon, welches für die Nitratreduktase kodiert (Hoffmann *et al.*, 1995).

So konnte gezeigt werden, dass *B. subtilis* während der Anaerobiose in der Lage ist, Energie durch Fermentation oder durch anaerobe Atmung zu generieren (Glaser *et al.*, 1995; Hoffmann *et al.*, 1998; Nakano and Hulett, 1997).

Die Art der Energiegewinnung wird durch die Anwesenheit und die Spezifität des Elektronenakzeptors bestimmt. Unter anaeroben Bedingungen erzielt *B. subtilis* den größten Energiegewinn durch Nitratatmung. Nitrat, als alternativer Elektronenakzeptor, wird durch die membrangebundene, dissimilatorische Nitratreduktase zu Nitrit reduziert. In einem zweiten Schritt wird das gebildete Nitrit durch die Nitritreduktase zu Ammonium umgewandelt (Gaballa *et al.*, 2003; Glaser *et al.*, 1995; Hoffmann *et al.*, 1998) (Abb. 1).

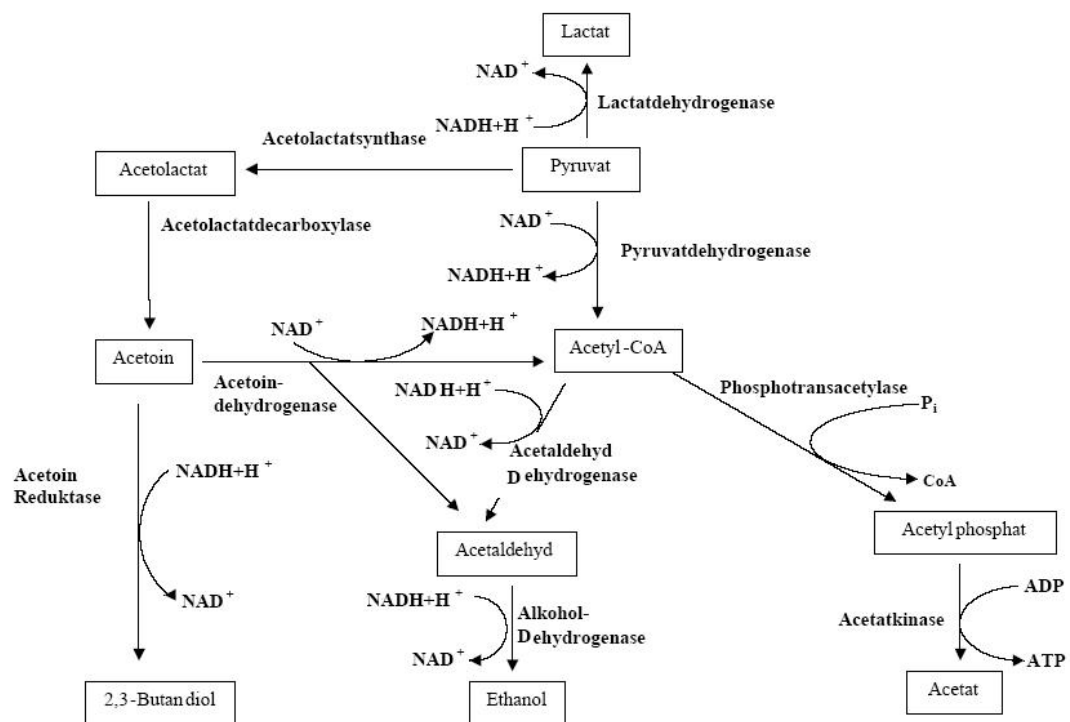


**Abb. 1: Ammonifikation in *B. subtilis*.** Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) wird durch die dissimilatorische, membrangebundene Nitratreduktase NarGHJI und die zelluläre Nitritreduktase NasDE über Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) zu Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) reduziert. Dabei findet eine Reoxidation des  $\text{NADH} + \text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$  statt (Reents, 2005).

Wenn kein Nitrat als terminaler Elektronenakzeptor verfügbar ist, fermentiert *B. subtilis* durch Substratkettenphosphorylierung die über die Glykolyse verwertbaren Zucker. In einer gemischten Säuregärung entstehen dabei Milchsäure, Ethanol, Acetoin und 2,3-Butandiol (Cruz Ramos *et al.*, 2000;

Nakano *et al.*, 1997). Über die Fermentation findet eine Regeneration von Reduktionsäquivalenten statt (Nakano *et al.*, 1998).

Ein aus vorangegangenen Arbeiten abgeleitetes Modell des fermentativen Stoffwechsels (Huang *et al.*, 1999; Nakano *et al.*, 1997) wurde 2000 von Cruz-Ramos *et al.* vorgeschlagen (Cruz Ramos *et al.*, 2000) (Abb. 2). Die hierbei wichtigen Enzyme sind die Lactatdehydrogenase, kodiert durch *ldh*, welche die Umsetzung von Pyruvat zu Lactat katalysiert, sowie die Pyruvatdehydrogenase, kodiert durch *pdh*, welche für die Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA verantwortlich ist. Ausgehend vom Acetyl-CoA katalysieren entweder die Phosphotransacetylase, kodiert durch *pta* und die Acetatkinase, kodiert durch *ack*, die Bildung des Endprodukts Acetat. Die Enzyme Acetaldehyddehydrogenase und Alkoholdehydrogenase katalysieren die Reaktion, die zur Bildung des Endprodukts Ethanol führen. Ein weiterer Weg, ausgehend vom Pyruvat ist die Reduktion des Pyruvats über Acetolactat und Acetoin zu 2,3-Butandiol. Für diese Reaktion sind die Enzyme Acetolactatsynthase, Acetolactatdecarboxylase, kodiert durch das *a/sSD*-Operon sowie die Acetoinreduktase verantwortlich. Acetoin wird nicht nur zu 2,3-Butandiol umgewandelt, sondern kann auch in einem weiteren Schritt durch die Acetoindehydrogenase, kodiert durch *acoABC* zu Acetyl-CoA oxidiert werden (Abb. 2).



**Abb. 2: Anaerober Fermentationsstoffwechsel in *B. subtilis*.** Bei folgenden Enzymen sind die Gene bereits bekannt: Lactatdehydrogenase (*ldh*), Acetolactatsynthase (*alsS*), Acetolactatdecarboxylase (*alsD*), Phosphotransacetylase (*pta*), Acetatkinase (*ack*), Acetoindehydrogenase (*acoABC*), Pyruvatdehydrogenase (*pdh*) (Cruz Ramos *et al.*, 2000).

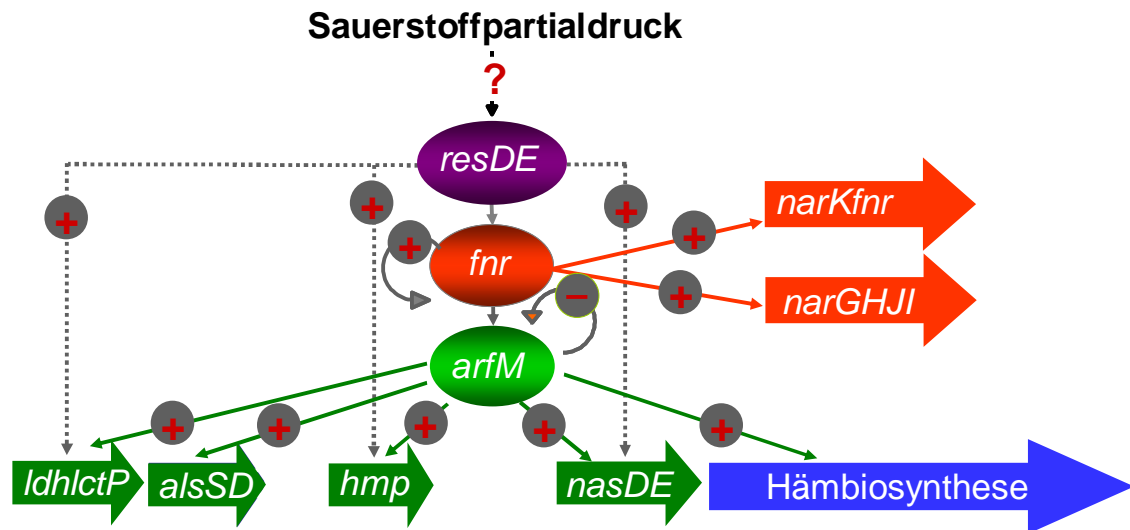
### 1.3 Die Regulation der Anaerobiose in *Bacillus subtilis*

In seinem primären Habitat, der nährstoffreichen oberen Bodenschicht, nutzt *B. subtilis* Sauerstoff als primären Elektronenakzeptor. Durch starke Regenfälle kann es in diesem Lebensraum zu Sauerstoffmangel kommen. *B. subtilis* muss sich dann schnell und effizient an die vorherrschenden Bedingungen anpassen, um in diesem Lebensraum überleben zu können (Nakano and Zuber, 1998).

Die Anpassung an einen verringerten Sauerstoffpartialdruck führt zur spezifischen Aktivierung von Genen, die für Proteine des anaeroben Stoffwechsels kodieren. Cruz-Ramos stellte im Jahr 2000 ein Modell dieser Regulationskaskade vor. Eine zentrale Aufgabe hat hier das Zweikomponentensystem ResDE, welches aus der Histidinkinase ResE und dem Antwortregulator ResD besteht. Dieses Zweikomponentensystem hat auch unter aeroben Bedingungen eine zentrale Aufgabe. Unter diesen Bedingungen induziert ResDE u. a. die Transkription der Gene *resA* und *cytA*, deren Genprodukte an der Hämbiosynthese beteiligt sind. Weiterhin reguliert dieses Zweikomponentensystem die Transkription des Pho-Regulon, dessen

Genprodukte für die Phosphat-Assimilation notwendig sind (Nakano *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 1996a).

Bis heute ist nicht bekannt, wie es unter anaeroben Bedingungen zur Aktivierung der membranständigen Sensorkinase ResE kommt. Bei einem niedrigen Sauerstoffpartialdruck überträgt die Kinase ResE eine Phosphatgruppe auf ResD, welche durch die Phosphorylierung aktiviert wird. Das aktive ResD reguliert unter anaeroben Bedingungen die Expression des *ldhLctP*-Operons, das für die Lactat-Dehydrogenase und die Lactat-Permease kodiert, des *nasDE*-Operons, welches für die Untereinheit der Nitritreduktase kodiert, des *hmp*-Gens, das für ein Flavohämoglobin kodiert, und aktiviert darüber hinaus auch die Expression des *fnr*-Gens, welches für den Redoxregulator Fnr kodiert (Cruz-Ramos *et al.*, 2000; Nakano and Zuber, 1998) (Abb. 3). Aktives Fnr reguliert die Expression des *narGHJ*-Operons und des *narKfnr*-Operons. Ersteres kodiert für die Untereinheiten der Nitratreduktase, letzteres den Nitrat/Nitrittransporter, sowie das *fnr*-Gen. Daher wird gleichzeitig die Expression des *fnr*-Gens durch Fnr positiv autoregulierte. Zusätzlich aktiviert Fnr die Expression des *arfM*-Gens. Dieses kodiert für einen Modulator, der anaeroben Respiration und Fermentation, ArfM (Cruz-Ramos *et al.*, 1995). ArfM moduliert die Expression der Gene der Hämbiosynthese, wie *hemN* und *hemZ* (Homuth *et al.*, 1999), sowie das *alsSD*-Operon der Acetolactat-Decarboxylase und -Synthase (Renna *et al.*, 1993). Weiterhin verstärkt der Modulator ArfM die Expression von *lctEP*, *nasDE* und *hmp* (Marino *et al.*, 2001) (Abb. 3).



**Abb. 3: Modell zur Regulation der Anaerobiose in *B. subtilis*.** Bei niedrigen Sauerstoffpartialdrücken induziert der Antwortregulator ResD die Genexpression von *fnr*, dessen Genprodukt Fnr die Transkription von *narGHJI* (kodiert für die Nitratreduktase), von *narK* (kodiert für einen Nitrat/Nitrittransporter) und *arfM* (kodiert für einen Modulator der anaeroben Respiration und Fermentation) induziert. ArfM verstärkt die Expression weiterer Gene: *ldhLctP* (Lactat-Dehydrogenase und -Permease), *alsSD* (Acetolactat-Synthase und -Decarboxylase), *nasDE* (Nitritreduktase), *hmp* (Flavohämoglobin) und Gene der Hämbiosynthese (Marino *et al.*, 2001).

## 1.4 Das Fnr-Regulon in *Bacillus subtilis*

In dem Gram-negativen Modellorganismus *E. coli* ist Fnr der zentrale Regulator in der Anaerobiose. Das Regulon umfasst 70 Gene, die über Fnr beeinflusst werden. Fnr aktiviert u. a. die Expression von Genen der Nitratreduktase (*narGHJI*), der zwei Nitritreduktasen (*nir* und *nrf*), des Nitrat/Nitrittransporters *narK* und der Pyruvat-Formiat-Lyase. Des Weiteren reprimiert Fnr seine eigene Expression (Guest *et al.*, 1996). Das Fnr aus *E. coli* fungiert dementsprechend als Aktivator, aber auch als Repressor (Spiro and Guest, 1990).

Das Fnr-Regulon in *B. subtilis* konnte über DNA-Macroarray-Analysen definiert werden (Reents *et al.*, 2006b). In dieser Arbeit konnten 30 Gene, welche zum Teil in 9 Operons organisiert sind als Fnr-abhängig identifiziert werden. Diese Gene konnten nach ihren verschiedenen Expressionsprofilen, in vier Gengruppen eingeteilt werden (Abb. 4) (Reents *et al.*, 2006b).

Die Gene der Gruppe 1 sind unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat, sowie unter fermentativen Wachstumsbedingungen, direkt durch Fnr induziert. Weiterhin besitzen sie in ihrem Promotor eine konservierte palindromische Fnr-Bindesequenz an Position -40,5 bzw. -41,5 relativ zum

Transkriptionsstartpunkt. Zu dieser Gruppe zählen *narKfnr*, *narGHJI* und *arfM* (Abb. 4) (Reents *et al.*, 2006b).

Die Gene der Gruppe 2 sind unter anaeroben respiratorischen Bedingungen indirekt über Fnr reprimiert. Zu dieser Gruppe gehören *alsSD*, *ldhIctP*, *ywcJ* und *cydABCD*. In den nichtkodierenden Bereichen der Gene *alsSD*, *ldhIctP* und *ywcJ* wurden konservierte potentielle Fnr-Bindestellen detektiert. Es konnte dabei aber gezeigt werden, dass Fnr keinen direkten Einfluss auf die Repression dieser Gene besitzt. Diese Repression unter anaeroben respiratorischen Bedingungen wird durch den Repressor Rex (Wang *et al.*, 2008) bedingt. Die Aktivität dieses Repressors ist abhängig vom NADH/NAD<sup>+</sup> Quotienten in der Zelle. Dieser ist unter anaeroben Bedingungen abhängig von der Bildung und Aktivität der Nitratreduktase (NarGHJI), deren Expression wiederum direkt über Fnr reguliert wird (Abb. 4) (Reents *et al.*, 2006b).

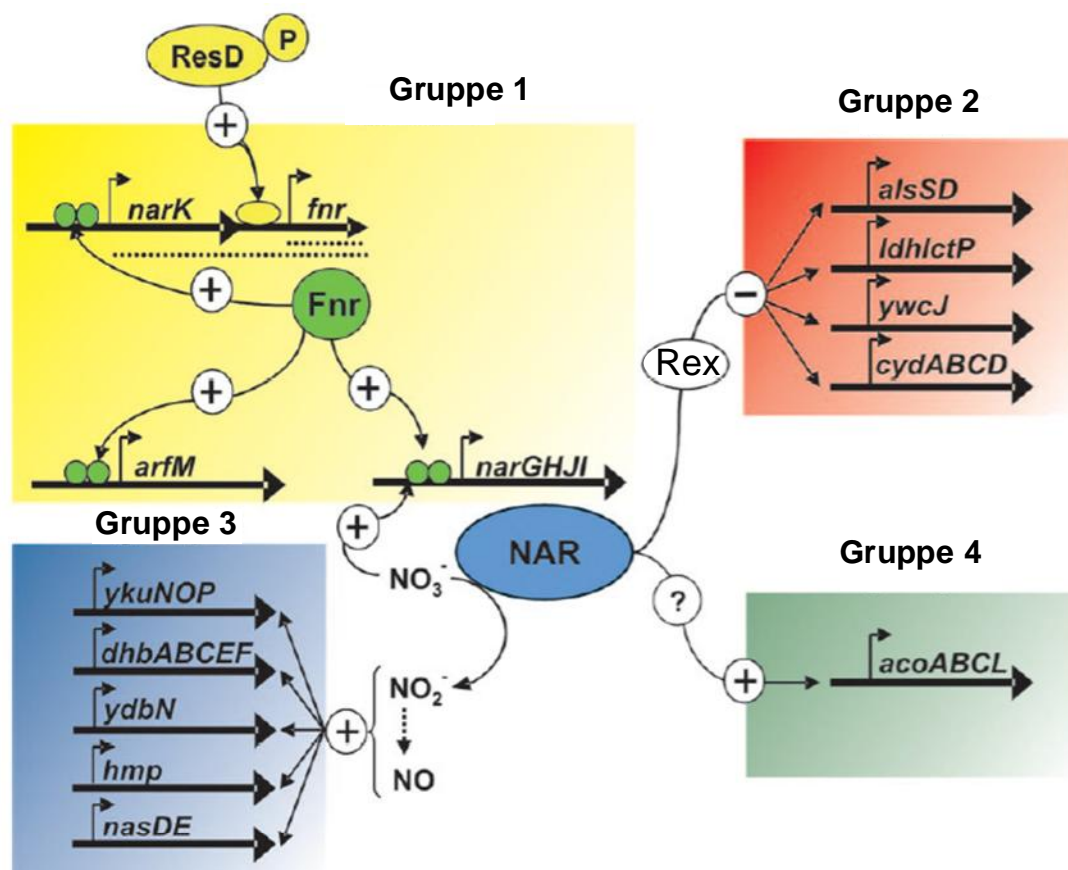
Die Gene der Gruppe 3 werden durch ihre indirekte Induktion durch Fnr während der Nitratatmung charakterisiert, die unter fermentativen Bedingungen ausbleibt. Diese Gene besitzen keine konservierte Fnr-Bindestelle in ihrem Promotor. Zu dieser Gruppe gehören *ydbN*, *ykuNOP*, *dhbABCEF*, *hmp* und *nasDE*. Die transkriptionelle Aktivierung dieser Gene ist abhängig vom Nitrit oder Stickstoffmonoxidgehalt in der Zelle. Dieser wird wiederum durch die Nitratreduktase NarGHJI beeinflusst, welche Nitrat zu Nitrit reduziert. Aus Nitrit kann in wässriger Lösung Stickstoffmonoxid entstehen, das Produkt der Umsetzung von Nitrat durch die Nitratreduktase (Nakano, 2002). Somit reguliert Fnr indirekt über die Nitratreduktase die Nitrit- und damit die Stickstoffmonoxidkonzentration in der Zelle.

Für die Gene *dhbABCEF*, *ykuNOP* und *ydbN* der Gengruppe 3 ist die Abhängigkeit vom Eisenregulator Fur bekannt. In *B. subtilis* ist Fur der Hauptregulator der Eisen-Assimilation, indem er die eisenabhängigen Gene reprimiert (Baichoo and Helmann, 2002). Stickstoffmonoxid kann zu einer Nitrosylierung von Fur führen und damit zu einer Derepression von Genen des Fur-Regulons (Moore *et al.*, 2004). Die Gene der Gengruppe 3 überlappen nicht nur mit dem Fur-Regulon, sondern auch mit dem ResDE-Regulon, wie z.B. *hmp* oder *nasDE*. Für *hmp* und *nasDE* ist eine Stickstoffmonoxid-induzierte Genexpression bekannt (Moore *et al.*, 2004; Nakano, 2002). So sind die Gene



der Gengruppe 3 nur indirekt abhängig vom Nitritgehalt, aber direkt abhängig vom Gehalt an Stickstoffmonoxid in der Zelle (Abb. 4) (Reents *et al.*, 2006b).

In der Gengruppe 4 findet man ausschließlich das *acoABCL*-Operon. Dieses Operon kodiert für einen Acetoindehydrogenase-Enzym-Komplex, der die Umwandlung von Acetoin bei Abwesenheit anderer Kohlenstoffquellen katalysiert. Dieses Operon ist unter anaeroben Bedingungen strikt abhängig von Fnr, besitzt aber keine konservierte Fnr DNA-Bindestelle in der Promotorregion. Es konnte gezeigt werden, dass die *acoA*-Expression über die Nitratreduktase, deren Bildung direkt Fnr-abhängig ist, unter Sauerstoffmangel und Nitrat-abhängig induziert wird. Der genaue Mechanismus ist bis jetzt noch unbekannt (Abb. 4) (Reents *et al.*, 2006b).

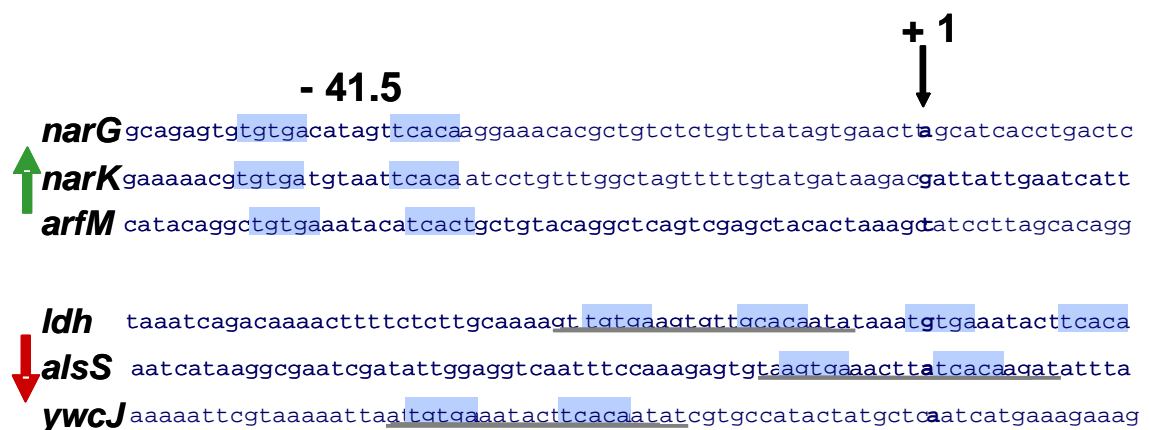


**Abb. 4: Modell des Fnr-Regulons.** Unter anaeroben Bedingungen induziert Fnr direkt die Transkription von *narGHJI*, *arfM*, und *narKfnr* (Gruppe 1). Durch Regulation der Expression der Nitratreduktase durch Fnr, reprimiert Fnr indirekt die Genexpression von *alsSD*, *ldhIctP*, *ywcJ*, and *cydABCD* über Rex (Gruppe 2). Durch die Entstehung von NO aus Nitrit, welches als second messenger fungiert, wird die Transkription einer Reihe von Genen induziert, die mit dem Fur- und ResDE-Regulon überlappen (Gruppe 3). Die Expression des einzigen Mitglieds der Gengruppe 4 *acoABCL* ist abhängig von der Fnr-abhängig gebildeten Nitratreduktase. (Reents *et al.*, 2006b)

## 1.5. Die Spezifität der DNA-Bindung des Fnr aus *Bacillus subtilis*

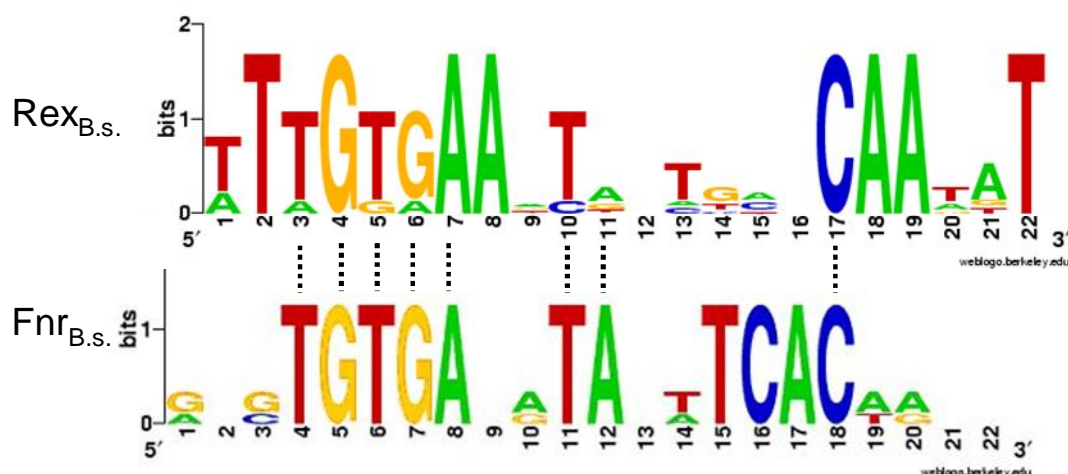
Im Jahr 2001 konnte für das Fnr aus *B. subtilis* die palindromische DNA-Bindesequenz, als ein 16 Basenpaar langes Palindrom 5'-TGTGA-N<sub>6</sub>-TCACA-3' identifiziert werden (Marino *et al.*, 2001). Diese Erkennungssequenz ist identisch mit der DNA-Bindestelle des Crp aus *E. coli* (Ebright *et al.*, 1987). Durch funktionelle-, kombiniert mit bioinformatischen Analysen konnte gezeigt werden, dass eine konservierte Fnr-Bindestelle in sechs nicht-kodierenden Bereichen von Genen des Fnr-Regulons der Gengruppe 1 und 2 (*narGHJI*, *narK*, *arfM*, *ldhIctP*, *alsSD* und *ywcJ*) vorhanden ist. Doch nur die Gene der Gengruppe 1 (*narGHJI*, *narK* und *arfM*), bei denen die palindromische Sequenz -40,5 oder -41,5 relativ zum Transkriptionsstartpunkt liegt, werden direkt über Fnr reguliert. Die Gene der Gengruppe 2 (*ldhIctP*, *alsSD* und *ywcJ*) werden Fnr-abhängig reprimiert. Die Gene der Gengruppe 2 werden über Fnr indirekt reguliert, da ihre Expression abhängig von dem Vorhandensein der funktionellen Nitratreduktase in der Zelle ist. Die Repression der Fermentationsgene findet unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat statt. Dies gewährleistet, dass keine Fermentation stattfindet, solange viel Energie über die Nitratatmung gewonnen wird. Unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat wird NADH aus dem Metabolismus an der Elektronentransportkette zu NAD<sup>+</sup> oxidiert. In *B. subtilis* wurde ein Regulator identifiziert, der auf den cytoplasmatischen NADH/NAD<sup>+</sup> Quotienten reagiert, welcher unter anaeroben Bedingungen in Anwesenheit von Nitrat durch die Bildung der Nitratreduktase über Fnr beeinflusst wird. Dieser Regulator wurde als Rex beschrieben (Larsson *et al.*, 2005). Ist der NADH/NAD<sup>+</sup> Quotient niedrig, bindet Rex NAD<sup>+</sup> und nimmt eine starre Konformation ein, in der Rex an die DNA bindet und die Expression für die Fermentation wichtiger Gene reprimiert. Steigt jedoch NADH/NAD<sup>+</sup> Quotient, so bindet Rex NADH mit einer höheren Affinität. Es kommt zu einer Konformationsänderung, in der Rex nicht weiter an die DNA bindet (Larsson *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008). In den nicht-kodierenden Bereichen von *ldhIctP*, *alsSD* und *ywcJ* sind jedoch hoch-konservierte Fnr Bindesequenzen zu finden, die nicht funktionell sind. Auch in einem Fnr-Knock-out-Stamm ist die Repression der Fermentationsgene

vorhanden (Cruz Ramos *et al.*, 2000). In dem nicht kodierenden Bereich von *ldh* liegen zwei palindromische Sequenzen -16,5 und +7,5 relativ zum Transkriptionsstartpunkt vor. In dem nicht kodierenden Bereich von *alsSD* und *ywcJ* findet man eine palindromische Sequenz bei -2,5 bzw. bei -29,5 relativ zum Transkriptionsstartpunkt (Abb. 5). Interessanterweise überlappen diese potentiellen Fnr-Bindestellen mit Rex-Bindestellen, die als palindromische Sequenz über 20 bp angegeben werden.



**Abb. 5: Lokalisierung der potentiellen Fnr-Bindesequenz in den Promotorregionen der Gengruppe 1 und 2 Fnr abhängiger Gene.** Mögliche Fnr-Bindungsstellen sind blau markiert. Die Rex Bindestellen sind grau unterstrichen. Die angegebenen Positionen beziehen sich auf den transkriptionellen Startpunkt. Der Startpunkt der Transkription ist mit dick gedruckten Buchstaben markiert (Reents *et al.*, 2006b).

Vergleicht man die durch Computeranalysen erstellten Weblogos (www.prodoric.de) der DNA-Bindestelle von Fnr und Rex (Larsson *et al.*, 2005) aus *B. subtilis*, findet man eine große Übereinstimmung dieser palindromischen Sequenzen (Abb. 6).

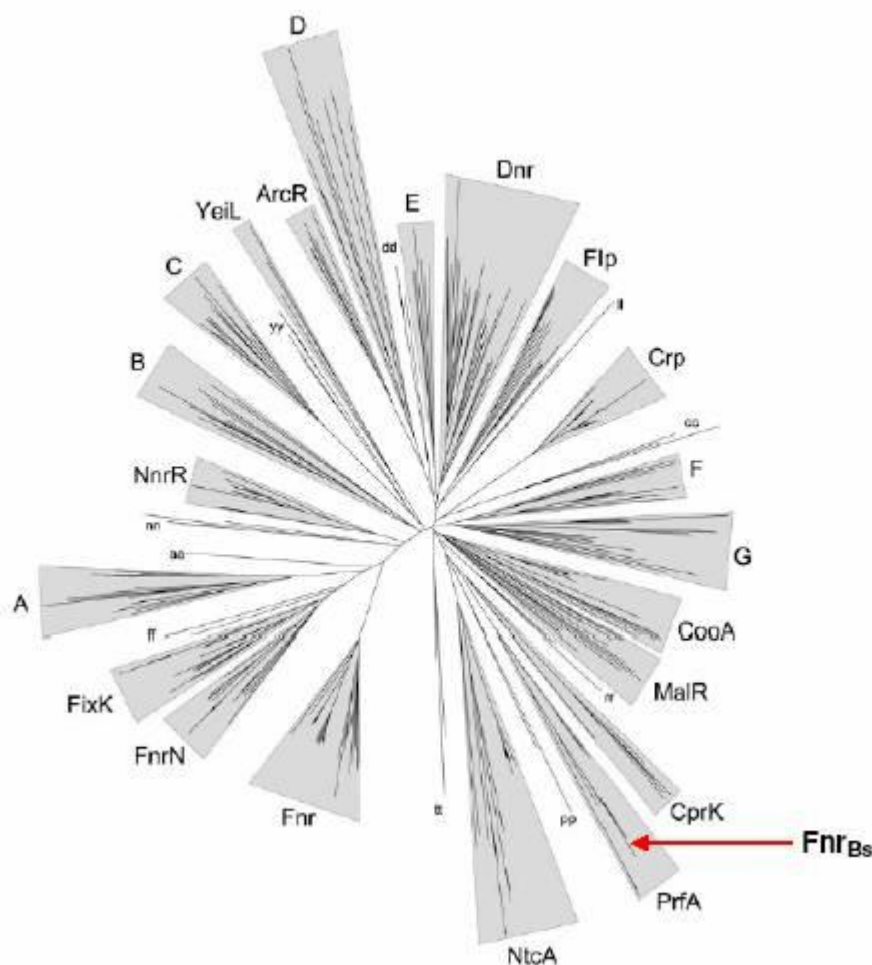


**Abb. 6: Vergleich der Sequenzlogos der Fnr- und Rex-DNA-Bindestellen.** Die Höhe jedes Buchstabens ist proportional zu der vorkommenden Frequenz in der palindromischen Sequenz.

Ob es dem Fnr-Protein dennoch möglich ist diese DNA-Bindestellen zu erkennen, konnte bisher nicht geklärt werden.

## **1.6 Die familiäre Einordnung des Redoxregulators Fnr aus *Bacillus subtilis***

Das Fnr aus *B. subtilis* gehört zur bakteriellen Crp/Fnr-Superfamilie von Transkriptionsfaktoren und ist nach dem Fnr-Protein von *E. coli* benannt (fumarate and nitrate reduction regulatory protein). Die Crp/Fnr-Familie setzt sich zurzeit aus über 1000 DNA-bindenden Proteinen zusammen. Charakteristisch für diese Familie ist die Größe der Proteine, welche alle 230-250 Aminosäuren besitzen. Ein weiteres wichtiges Merkmal dieser DNA-bindenden Proteine ist das C-terminale „Helix-Turn-Helix“-Motiv, welches die DNA-Bindung ursächlich bedingt. Weiterhin zeichnet sich die Crp/Fnr-Familie durch eine N-terminale Domäne aus, die Homologien zu der Nucleotid-bindenden Domäne des Crp aufweist. Die Mitglieder der Crp/Fnr-Familie werden in Gruppen eingeordnet, die jeweils nach dem wichtigsten Mitglied der jeweiligen Gruppe benannt sind (Abb. 7). Das Fnr aus *B. subtilis* wird der Gruppe PrfA zugeordnet. PrfA ist ein Regulator der Genexpression von Virulenzfaktoren aus *Listeria spp.* Die Sequenzidentität von *B. subtilis* Fnr und PrfA beträgt 21 % (Körner *et al.*, 2003)



**Abb. 7: Die Proteinphylogenie innerhalb der Crp-Fnr-Familie.** Die phylogenetischen Linien sind nach den wichtigsten Mitgliedern benannt. Gruppen ohne einen bekannten Regulator sind durch Großbuchstaben gekennzeichnet (aus Koerner *et al.* 2003).

Das Regulatorprotein Fnr aus *B. subtilis* gleicht hinsichtlich seiner Aminosäuresequenz eher dem *E. coli* Crp-Protein mit einer Identität von 23 % als dem *E. coli* Fnr, zu dem es eine Identität von 19 % besitzt. Besonders deutlich wird dies in der DNA-Bindedomäne, welche bei *B. subtilis* Fnr homolog ist mit der von *E. coli* Crp. Es besteht eine Wechselwirkung der DNA mit diesen Regulatoren über die Aminosäuresequenz RE-R im „Helix-Turn-Helix“-Motiv, im Gegensatz zur Bindedomäne des *E. coli* Fnr, bei dem die Reste E-SR die DNA-Bindung vermitteln (Ebright *et al.*, 1987; Guest *et al.*, 1996). Das *E. coli* Crp und das *E. coli* Fnr besitzen unterschiedliche Regulationsstrategien. Bei Glukosemangel in der Zelle wird durch die Adenylatcyclase cyclisches AMP gebildet. Dieser second messenger wird von Crp gebunden, wobei es zur Verstärkung der Expression von Genen kommt, die an der Verwertung alternativer Kohlenstoffquellen beteiligt sind (Crothers and Steitz, 1992). Das

Fnr aus *E. coli* besitzt im aktiven Zustand ein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum, das nur unter anaeroben Bedingungen stabil ist (Kiley and Beinert, 1998).

## 1.7 Das Eisen-Schwefel-Zentrum als proteinogener Kofaktor

Eisen-Schwefel-Zentren sind eine der ältesten proteinogenen Kofaktoren. In der Natur findet man verschiedene Variationen von Eisen-Schwefel-Zentren. Die am häufigsten vorkommenden Motive sind jedoch  $[2\text{Fe-2S}]$ - und  $[4\text{Fe-4S}]$ -Zentren, die meist über Cysteinreste von dem Protein koordiniert werden. Als Liganden sind jedoch auch Histidin- und Aspartatreste bekannt (Beinert, 2000)

Die Bildung eines Eisen-Schwefel-Zentrums wird durch das Zusammenspiel verschiedener Enzyme ermöglicht. Das am weitesten verbreitete System für die Biogenese von Eisen-Schwefel-Zentren ist das Isc-System (iron-sulfur-cluster) (Albrecht *et al.*, 2010). Es besteht aus dem *iscSUA*-Operon, wobei *iscS* für die Cysteindesulforase IscS kodiert. Diese katalysiert die Eliminierung von Schwefel aus L-Cystein, wodurch Alanin und enzymgebundener Schwefel entstehen (Flint and Allen, 1996). Das Eisen-bindene Protein IscA, welches durch *iscA* kodiert wird, assimiliert Eisen, das es dann für den Aufbau des Eisen-Schwefel-Zentrums zur Verfügung stellt. Schwefel und Eisen werden zu dem Eisen-Schwefel-Cluster-Gerüstprotein IscU transportiert, in dem dann die Bildung zu einem  $[2\text{Fe-2S}]$ -Zentrum stattfindet, welches gegebenenfalls zu einem  $[4\text{Fe-4S}]$ -Zentrum dimerisiert (Raulfs *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2006). Das gebildete Zentrum wird anschließend zum Apoprotein transportiert.

In *B. subtilis* findet sich kein zum Isc-System homologes System. Durch Homologievergleiche wurde nur ein dem Suf-System (sulfur mobilization) homologes System erkannt, welches von den *yurY-yurX-csd-yurV-yurU*-Genen, kodiert wird, die daraufhin zu *sufCDSUB* umbenannt worden sind. Dieses Operon enthält ein Eisen-Schwefel-Zentrum-Gerüstprotein (SufU), eine Cysteindesulforase (SufS) und einen energetischen Komplex (SufBCD). Das Suf-System in *E. coli* ist über das Fur-Regulon reguliert. In *B. subtilis* konnte bisher kein Regulator gefunden werden. Man nimmt an, dass dieses System zu den „essential“-Genen von *B. subtilis* zählt (Albrecht *et al.*, 2010)

Eisen-Schwefel-Zentren erfüllen viele verschiedene biologische Aufgaben. Die wichtigste davon ist der Elektronentransport, in Enzymkomplexen der Atmungskette, wie z. B. dem Cytochrom-*bc*<sub>1</sub>-Komplex, welcher unter anderem ein Eisen-Schwefel-Protein mit Rieske-Cluster für die Übertragung der Elektronen enthält. Dieser Komplex fungiert als Oxidoreduktase und katalysiert die Oxidoreduktion der Redoxkomponenten Ubichinon und Cytochrom c. Durch diese Reaktion wird ein elektrochemischer Gradient generiert, der wichtig für die ATP Synthese ist (John S. Rieske, 1964; Mitchell, 1975). Eine weitere wichtige Aufgabe findet man in der Substratbindung oder Katalyse von Reaktionen. So kann ein Eisen-Schwefel-Zentrum ein aktives Zentrum in einem Enzym darstellen. Dies ist deshalb möglich, weil ein Eisen-Schwefel-Zentrum Elektronen innerhalb des Zentrums, sowie auch innerhalb der Liganden verlagern kann. Dies führt zu einer Polarisierung gebundener Gruppen. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Aconitase, wo ein Eisen-Atom des Eisen-Schwefel-Zentrums als Lewis Säure fungiert und so die reversible Umlagerung von Citrat über das intermediär enzymgebundene cis-Aconitat zu Isocitrat katalysiert. Hierbei wird über ein Eisenatom des Eisen-Schwefel-Zentrums eine Hydroxylgruppe eliminiert woran sich eine Deprotonierung des Kohlenstoffs anschließt. Diese Hydroxylgruppe wird anschließend in umgekehrter Konfiguration an einen anderen Kohlenstoff addiert (Werst *et al.*, 1990).

Weitere Aufgaben für Eisen-Schwefel-Zentren findet man auf der regulatorischen Ebene, z. B. bei dem Sauerstoffsensoren Fnr aus *E. coli*.

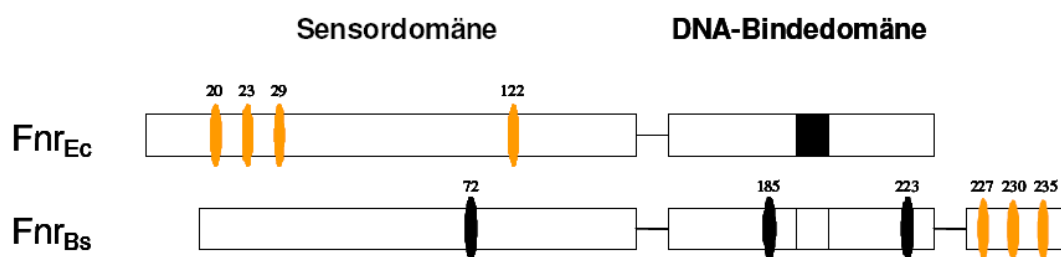
Das Fnr aus *E. coli* besitzt ein Eisen-Schwefel-Zentrum als Kofaktor, mittels dessen es auf den Sauerstoffpartialdruck des umgebenden Milieus reagieren kann. Das Fnr aus *E. coli* liegt unter aeroben Bedingungen in der Zelle als inaktives Monomer vor. Sinkt der Sauerstoffpartialdruck kommt es zur Ausbildung des [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrums und dadurch zur Dimerbildung (Moore and Kiley, 2001). Das aktive Dimer kann an die spezifischen Erkennungssequenzen im Promotorbereich wichtiger Gene der Anaerobiose binden und diese aktivieren (Guest *et al.*, 1996). Steigt der Sauerstoffpartialdruck in der Zelle, wird das [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrum zu einem [2Fe-2S]<sup>2+</sup>-Zentrum oxidiert, dieses zerfällt vollständig und das Protein geht in einen inaktiven Zustand über (Khoroshilova *et al.*, 1997; Sutton *et al.*, 2004). Das [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrum des

*E. coli* Fnr wird über drei N-terminal lokalisierte Cysteine Cys20, Cys23, Cys29 und das zentrale Cys122 koordiniert (Abb. 8).

Für den Regulator Fnr aus *B. subtilis* konnte durch UV/VIS- und ESR-Spektroskopie ein sauerstofflabiles  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum nachgewiesen werden, das bei einem reduzierten Sauerstoffpartialdruck ausgebildet wird und das Fnr in eine aktive Konformation übergeht (Reents *et al.*, 2006a).

Durch Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass die drei C-terminalen Cysteinreste Cys227, Cys230 und Cys235 an der Koordination des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums beteiligt sind. Dadurch sind sie wichtig für die *in vivo* Aktivität des Fnr aus *B. subtilis* (Reents, 2005) (Abb. 8). Noch ist der vierte Ligand, der an der Koordination des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums beteiligt ist, unbekannt (Reents *et al.*, 2006a).

Im Unterschied zum Fnr aus *E. coli* bildet das Fnr aus *B. subtilis* sowohl in inaktiver wie auch in aktiver Konformation ein Homodimer aus (Reents *et al.*, 2006a).



**Abb. 8: Strukturelle Organisation der Fnr Proteine aus *E. coli* und *B. subtilis*.** Die Cysteinreste des *E. coli* Fnr (Fnr<sub>Ec</sub>) und des *B. subtilis* Fnr (Fnr<sub>Bs</sub>), die an der Koordination des Eisen-Schwefel-Zentrums beteiligt sind, sind orange markiert. Die Cysteinreste des *B. subtilis* Fnr (Fnr<sub>Bs</sub>), die nicht an der Koordination des Eisen-Schwefel-Zentrums beteiligt sind, sind schwarz markiert. Die unterschiedlichen DNA-Bindungsmotive sind als schwarz gefüllte Box (E-SR) und schwarz umrahmte Box (RE-R) dargestellt.

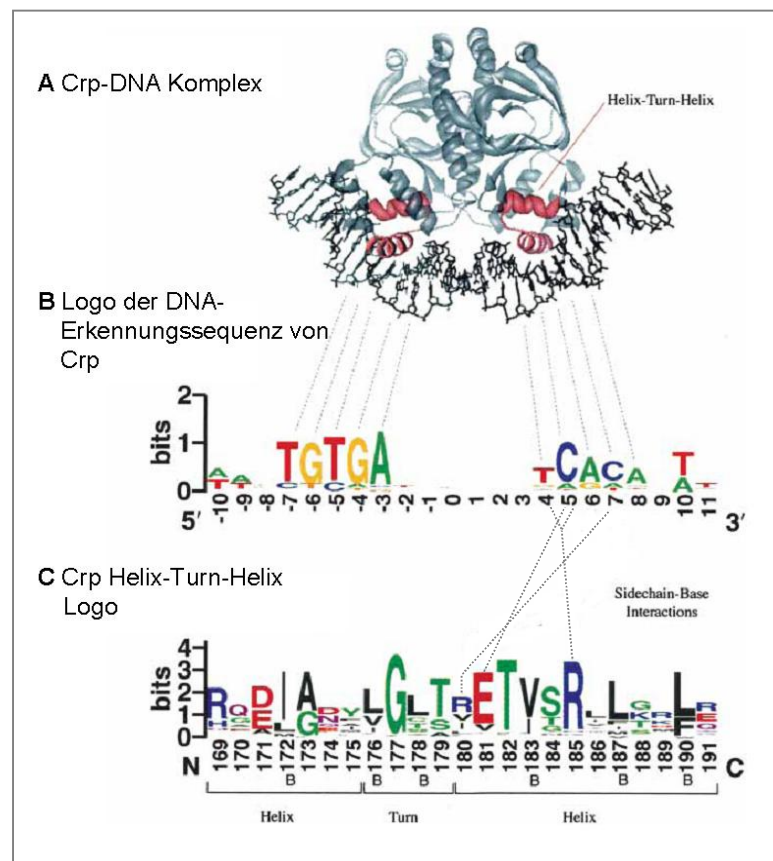
## 1.8 Das DNA-Bindemotiv von Regulatoren der Crp/Fnr-Familie

Die Regulatoren der Crp/Fnr-Familie binden über das Helix-Turn-Helix DNA-Bindemotiv, welches sich in der C-terminalen Domäne der Transkriptionsfaktoren befindet, an die DNA. Das Helix-Turn-Helix-Motiv besteht aus 2  $\alpha$ -Helices, die durch einen Turn verbunden sind. Die Regulatoren binden über dieses Motiv in der großen Furche der DNA in der Promotorregion ihrer Zielgene (Körner *et al.*, 2003). Die DNA-Bindung des Transkriptionsregulators Crp aus *E. coli* ist durch Strukturaufklärung des



Transkriptionsfaktors mit DNA sowie Mutationsanalysen, das am Besten untersuchte Beispiel in der Crp/Fnr-Familie (Schultz *et al.*, 1991).

Die Crp Bindstelle enthält eine palindromische Sequenz aus 22 Basen 5'-AA N<sub>1</sub> TGTGA N<sub>6</sub> TCACA N<sub>1</sub> TT -3' (Abb. 9), wobei jedes Monomer des Homodimers an eine Halbseite der palindromischen Sequenz bindet (Ebright *et al.*, 1987). Jede Halbseite befindet sich in der großen Furche der DNA. Die Bindestelle ist zwischen der Position -41 bis -103 relativ zum Transkriptionsstartpunkt in den Promotoren seiner über 100 Zielgene zu finden. In der Aminosäuresequenz des Crps bilden die Aminosäurereste 169-191 das typische Helix-Turn-Helix-Motiv aus, wobei besonders die zweite Helix des Helix-Turn-Helix-Motivs für die Sequenzerkennung wichtig ist. Die Aminosäurereste Arg180, Glu181 und Arg185 gehen einen direkten Kontakt mit der DNA durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken an drei Basen der palindromischen Sequenz ein. Arg180 interagiert über die Guanidingruppe der Seitenkette mit O<sub>6</sub> und N<sub>7</sub> der Base Guanin an Position 7 (Abb. 9). Der Aminosäurerest Glu181 ist wichtig für die Affinität der Interaktion und bildet mit seiner Carboxylgruppe eine Wasserstoffbrücke mit N<sub>4</sub> des Cytosin an Position 5 aus (Abb. 9). Der Aminosäurerest Arg185 kann über seine Guanidingruppe entweder mit O<sub>6</sub> oder N<sub>7</sub> der Base Guanin an Position 5 interagieren, bei gleichzeitiger Interaktion mit O<sub>4</sub> der Base Thymin an Position 4 (Abb. 9). Zur Stabilisierung der Bindung bilden hauptsächlich Aminosäuren der DNA-Bindedomäne Wasserstoffbrücken mit dem Phosphatrückgrat der DNA aus. Jedes Monomer des Crps knickt die DNA um ca. 40°, so dass eine Biegung der DNA durch die Bindung des Transkriptionsfaktors um ungefähr 90° entsteht (Ebright, 1991; Parkinson *et al.*, 1996; Schultz *et al.*, 1991).



**Abb. 9: Die DNA-Bindung des Regulators Crp aus *E. coli*** (A) Kristallstruktur des Crp-DNA Komplexes. Das Helix-Turn-Helix-Motiv ist rot dargestellt. (B) Logo der Crp DNA-Erkennungssequenz. (C) Logo des Crp Helix-Turn-Helix Motivs. Die Interaktionen der Aminosäurereste mit den jeweiligen Basen der DNA sind durch Striche gekennzeichnet. (modifiziert nach (Crooks *et al.*, 2004))

Homologievergleiche des Crp aus *E. coli* mit dem Fnr aus *B. subtilis* zeigen hohe Übereinstimmungen im Bereich des Helix-Turn-Helix-Motivs. Für das *B. subtilis* Fnr, konnten jedoch die Aminosäuren, die für den direkten Kontakt mit der DNA zuständig sind, noch nicht bestimmt werden.

## 1.9 Die Transaktivierung der Regulatoren der Crp/Fnr-Familie

*B. subtilis* besitzt eine RNA-Polymerase (RNAP), deren katalytisches Core-Enzym aus den 4 Untereinheiten ( $\alpha$ )<sub>2</sub> sowie  $\beta$  und  $\beta'$  besteht. Nach der Bindung eines Sigmafaktors wird von dem Holoenzym die Transkription initiiert (Avila *et al.*, 1970). Durch den Sigmafaktor findet die Bindung der RNAP an den Promotor statt. *B. subtilis* besitzt 17 verschiedene Sigmafaktoren, die als Antwort auf verschiedene Umweltbedingungen die Transkription aktivieren (Haldenwang, 1995; Helmann, 1999). Die  $\alpha$ -Untereinheit der RNAP unterteilt

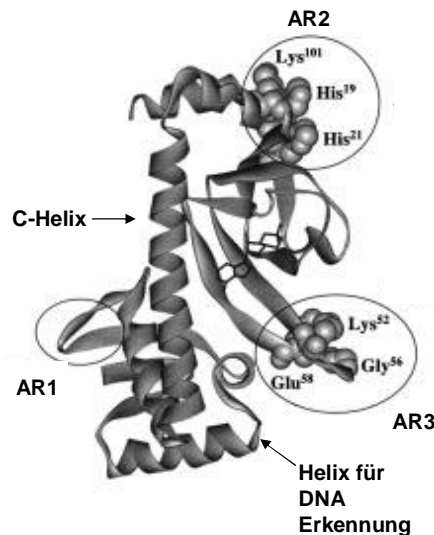
sich in eine N-terminale ( $\alpha$ NTD) und eine C-terminale Domäne ( $\alpha$ CTD), die durch einen flexiblen Linker getrennt sind. Der Linker ermöglicht eine variable Bindung stromaufwärts des Promotors der  $\alpha$ CTD der RNAP an verschiedene Promotoren (Ebright and Busby, 1995). Wird für die Initiation der Transkription ein Transkriptionsfaktor benötigt, findet die direkte Protein-Protein Wechselwirkung des Faktors über die  $\alpha$ CTD und/oder den Sigmafaktor der RNAP statt (Bell and Busby, 1994; Busby and Ebright, 1999).

Unter anderem wurden 2 wichtige Klassen von Promotoren für die Transkriptionsfaktoren Crp und Fnr aus *E. coli* beschrieben. Dabei handelt es sich um Klasse I Promotoren, bei denen die Bindestelle bei -71,5 bzw. -61,5 relativ zum Transkriptionsstartpunkt vorliegt, und Klasse II Promotoren, mit der Bindestelle -41,5 relativ zum Transkriptionsstartpunkt. Die -35 Region wird bei den Klasse II Promotoren vom Transkriptionsfaktor überlagert (Blake *et al.*, 2002; Busby and Ebright, 1999; Williams *et al.*, 1996). Fnr aus *B. subtilis* reguliert dagegen nur Promotoren der Klasse II, wobei die Bindestelle bei -41,5 bzw. -40,5 relativ zum Transkriptionsstartpunkt liegt (Reents *et al.*, 2006b).

Für die Transkriptionsfaktoren der Crp/Fnr-Superfamilie wurden drei Kontaktstellen mit der RNAP charakterisiert, die so genannten activating regions (AR1, AR2 und AR3) (Blake *et al.*, 2002). Diese Kontaktstellen sind entweder nach außen disponierte Loops oder ein Patch positiv geladener Aminosäurereste in der Tertiärstruktur des Proteins. Wieviele dieser Kontaktstellen an der Wechselwirkung mit der RNAP beteiligt sind, ist Promotor abhängig.

Für die Aktivierung dieser Klasse II Promotoren bindet das Crp aus *E. coli* als Homodimer an die DNA. Die Kontaktstellen AR1, 2 und 3 gestalten den Kontakt mit der RNAP. Die stromabwärts liegende Untereinheit des Crp Dimers kontaktiert die  $\alpha$ CTD der RNAP mit der AR1. Bei der AR1 handelt es sich um einen an der Oberfläche exponierten Loop (AS 156-164), der die Bindung mit der RNAP verbessert (West *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 1994a; Zhou *et al.*, 1994b). Die stromabwärts gelegene Untereinheit des Crp Dimers beinhaltet einen Patch mit positiv geladenen Aminosäureresten (AR2) (His19, 21 und Lys101) (Abb. 10) welcher mit negativ geladenen Aminosäurereste der  $\alpha$ NTD interagiert. Über den Kontakt mit AR2 wird die

Isomerisierungsrate vom geschlossenen zum offenen Komplex der DNA beeinflusst (Busby and Ebright, 1999; Niu *et al.*, 1996) (Abb. 10).

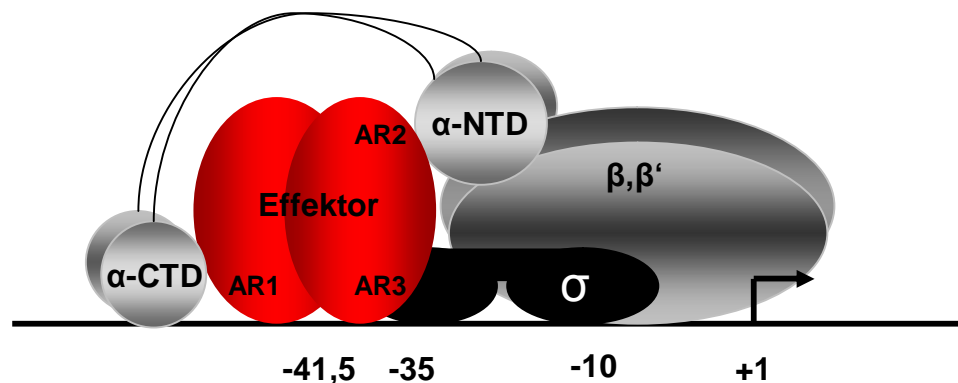


**Abb. 10: Struktur eines Crp Monomer aus *E. coli*.** Die Positionen der activating regions (AR1, AR2 und AR3) sind durch Kreise markiert. Die Helix für die Dimerisierung ist als C-Helix beschrieben (Leduc *et al.*, 2001).

Die Kontaktstelle AR3 ist als ein oberflächenexponierter Loop (AS 51-60) charakterisiert, der zwischen dem 4 und 5  $\beta$ -Faltblatt des Proteins liegt. Der Kontakt erfolgt hauptsächlich über negativ geladenen Aminosäuren, die mit positiv geladenen Aminosäuren des Sigmafaktors wechselwirken (Niu *et al.*, 1996; Rhodius and Busby, 2000a, 2000b; West *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1996).

Das Fnr aus *E. coli* benötigt ebenfalls die Kontaktstellen AR1, 2 und 3 für die Aktivierung von Klasse II Promotoren (Blake *et al.*, 2002). Die AR1 des Fnr aus *E. coli* beschleunigt den Übergang der DNA vom geschlossenen zum offenen Komplex. Diese Kontaktstelle besteht im Vergleich zu Crp nicht nur aus einem Loop. Die Oberfläche wird hier durch das Zusammenspiel aus 3 Loops (AS 71-75, 116-121 und 181-191) (Lamberg *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 1997; Wing *et al.*, 2000), vergrößert. Die AR2 des *E. coli* Fnr ist vergleichbar der activating region AR2 von Crp und wird über die Aminosäurereste Lys49 und 50 ausgebildet (Blake *et al.*, 2002). Über die AR3 des *E. coli* Fnr (AS 80-89)

kommt es zu einer direkten Aktivierung durch Kontakt mit dem Sigmafaktor (Abb. 11) (Lamberg *et al.*, 2002; Lonetto *et al.*, 1998).



**Abb. 11: Schematische Darstellung der Aktivierung der Transkription von Klasse II Promotoren** Der Effektor bindet als Dimer an seine Bindestelle bei -41,5 relativ zum Transkriptionsstartpunkt. Die RNAP, bestehend aus  $(\alpha)_2 \beta \beta' \sigma$  bindet ebenfalls an den Promotor und interagiert mit den 3 activating regions des Effektors. Die AR1 Region des Effektors wechselwirkt mit einer  $\alpha$ CTD der  $(\alpha)_2$ -Untereinheit der Polymerase. Die AR2 des Effektors interagiert mit der  $\alpha$ NTD der  $(\alpha)_2$ -Untereinheit. Die  $\alpha$ NTD und  $\alpha$ CTD sind durch einen flexiblen Linker getrennt. Die AR3 interagiert mit dem Sigmafaktor.

## 2. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Dissertation war die funktionelle Charakterisierung des Redoxregulator Fnr aus *B. subtilis*. Unter anaeroben Bedingungen koordiniert Fnr ein sauerstofflabiles  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  Zentrum, das über drei Cysteine gebunden wird. Der vierte Ligand war bisher unbekannt. Fnr bindet im aktiven Zustand als Homodimer an die DNA und aktiviert nach Interaktion mit der RNA-Polymerase die Transkription.

Durch gezielte Mutagenese einzelner Aminosäuren im Fnr Protein sollten die funktionellen Domänen charakterisiert werden.

- Untersuchung von Aspartatresten im *B. subtilis* Fnrs, als potentielle vierte Liganden des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums
- Identifizierung von Aminosäuresten im Helix-Turn-Helix DNA Bindemotiv als Kontaktstellen zur DNA
- Identifizierung der Kontaktstelle mit der RNA Polymerase
- Analyse der Bedeutung der  $\alpha$ D-Helix im Fnr aus *B. subtilis*

Die Fnr Mutantenproteine sollten anschliessend im *in vivo* Komplementationssystem auf ihre Funktionalität hin überprüft werden. Die Fnr Mutantenproteine sollten heterolog produziert und gereinigt werden um *in vitro* charakterisiert zu werden. So kann die Koordination des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  Zentrum mit Hilfe spektroskopischer Untersuchungen wie UV/VIS- und Mößbauerspektroskopie analysiert werden. Die Bindungsfähigkeit der Fnr Proteine soll durch DNaseI in *in vitro* Bindungsstudien untersucht werden. Ferner soll die Funktionalität der gereinigten Fnr Mutantenproteinen auch in *in vitro* Transkriptions Analysen getestet werden.

Ein weiteres Ziel war die Kristallisation und Strukturaufklärung des Fnrs aus *B. subtilis* bzw. aus *G. stearothermophilus*, welches dafür zunächst rekombinant produziert und gereinigt werden sollte.

Um die Regulation verschiedener Promotoren anaerob regulierter Gene durch Bindung von Fnr oder anderen Reglatoren untersuchen zu können sollte die Chromatin- affinity-purification Methode, **ChAP**, ein *in vivo* DNA-Bindungssystem etabliert werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Abkürzungsverzeichnis

|                |  |
|----------------|--|
| $A_{\lambda}$  | Absorption von Licht mit der Wellenlänge $\lambda$ [nm]  |
| Amp            | Ampicillin   |
| APS            | Aminoperoxodisulfat                                      |
| $\beta$ -Gal   | $\beta$ -Galaktosidase                                   |
| BCIP           | (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat, Toluidin-Salz)       |
| bp             | Basenpaare   |
| BSA            | Rinderserumalbumin ("Bovine Serum Albumin")              |
| Cml            | Chloramphenicol  |
| Da             | Dalton   |
| DNA            | Desoxyribonukleinsäure                                   |
| DNase          | Desoxyribonuklease                                       |
| ds             | doppelsträngig   |
| DTT            | Dithiothreitol   |
| DMF            | <i>N,N</i> -Dimethylformamid                             |
| EDTA           | Ethylendiamin-Tetraessigsäure                            |
| HEPES          | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure    |
| Kan            | Kanamycin  |
| kb             | Kilobasen  |
| Konz.          | Konzentration  |
| LB             | Luria Bertani  |
| $M_r$          | relative molekulare Masse                                |
| NBT            | Nitroblautetrazoliumchlorid                              |
| $OD_{\lambda}$ | Optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda$ [nm] |
| ONPG           | 2-Nitrophenol- $\beta$ -D-Galaktopyranosid               |
| PBS            | Phosphate buffered saline                                |
| PCR            | Polymerase-Kettenreaktion                                |
| PIPES          | Piperazine- <i>N,N'</i> -bis(2-ethanesulfonic Säure)     |
| PMSF           | Phenylmethylsulfonylfluorid                              |
| RNase          | Ribonuklease   |

|          |  |
|----------|--|
| RT       | Raumtemperatur                                       |
| upm      | Umdrehungen pro Minute                               |
| Spec     | Spectinomycin  |
| SDS      | Natriumdodecylsulfat                                 |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| ss       | einzelsträngig                                       |
| Tet      | Tetrazyklin  |
| Tris     | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                     |
| WT       | Wildtyp  |
| w/v      | Gewicht pro Volumen (weight per volume)              |
| β-ME     | β-Mercaptoethanol                                    |
| λ        | Wellenlänge  |

### 3.2 Geräte

|                          |  |   |
|--------------------------|--|---|
| Agarosegelelektrophorese | Agagel Mini                                    | Biometra, Göttingen,<br>Deutschland                             |
| Agarosegelfotos          | GelDoc<br>Quantity One                         | BioRad, München,<br>Deutschland                                 |
| Anarobenbox              | MACS-MG-1000<br>anaerobic workstation          | Don Whitley Scientific,<br>West Yorkshire, UK<br>Coy Laboratory |
| Anaerobenzelt            |  | Products inc.,<br>Michigan, USA                                 |
| Autoklav                 | FVA/A1   | Fedegari Autoklaven<br>AG, Bedero, Schweiz                      |
| Elektroporation          | Gene Pulser II<br>mit Pulse Contoller          | BioRad, München,<br>Deutschland                                 |
| Feinwaage                | BP 61S   | Satorius, Göttingen,<br>Deutschland                             |
| Frenchpress              | French <sup>®</sup> pressure cell<br>press     | Thermo Fisher<br>scientific,                                    |
| Kapillarsequenzierer     | Genetic Analyzer ABI<br>Prism <sup>™</sup> 310 | Applied Biosystems  |



|                                      |                                   |   |
|--------------------------------------|-----------------------------------|---|
| pH-Messgerät                         | pH-Meter C 6840B                  | Schott, Mainz,<br>Deutschland   |
| Phosphor-Screen                      | Kodak-Storage,<br>Phosphor-Screen | Molecular Dynamics,<br>Sunnyvale, USA<br>Amersham                             |
| Photometer                           | Ultrospec 2000                    | Biosciences,<br>Piscataway, USA<br>ABIMED GmbH,<br>Langenfeld,<br>Deutschland |
| Pipetten                             | Labmate                           | MS Laborgeräte,<br>Wiesloch, Deutschland                                      |
| Röntgenfilm-<br>Entwicklungsmaschine | Optimax Typ TR                    | BioRad, München,<br>Deutschland   |
| SDS-PAGE-Apparatur                   | Mini Protean II                   | Biometra, Göttingen,<br>Deutschland   |
| Thermocycler                         | T personal                        | Eppendorf, Wesseling-<br>Berzdorf, Deutschland                                |
| Thermomixer                          | Thermomixer compact               | BANDELIN electronic,<br>Berlin, Deutschland                                   |
| Ultraschall                          | Sonoplus HD2070MS                 | Stratagene, La Jolla,<br>USA  |
| UV-Crosslinker                       | UV Stratalinker 2400              | Jasco   |
| UV/VIS-<br>Spektrophotometer         | V-550                             | Satorius, Göttingen,<br>Deutschland   |
| Waagen                               | SBA 52                            | HAT Infors AG,<br>Bottmingen, Schweiz   |
| Wasserbadschüttler                   | Aquatron                          | Eppendorf, Wesseling-<br>Berzdorf, Deutschland                                |
| Zentrifugen                          | Eppendorf MiniSpin                | Heraeus, Hanau,<br>Deutschland  |
|                                      | Biofuge fresco                    | Sorvall   |
|                                      | RC 5B Plus                        |   |

Bekman Coulter

Bekman Coulter

### 3.3 Chemikalien

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden die Chemikalien und Reagenzien von folgenden Firmen bezogen: Sigma (München, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Riedel-de-Häen (München, Deutschland) und Difco Laboratories GmbH (Augsburg, Deutschland).

### 3.4 Kommerzielle Kits und Enzyme

#### 3.4.1 Kommerzielle Kits

|   |  |
|---|--|
| QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit | Stratagene, La Jolla, USA                  |
| QIAquick® Gel Extraction Kit              | Qiagen, Hilden, Deutschland                |
| QIAquick® PCR Purification Kit            | Qiagen, Hilden, Deutschland                |
| 2DQuant Kit                               | Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland |
| Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit     | usb, Ohio, USA                             |
| CDP-Star                                  | Roche, Mannheim, Germany                   |
| Kristallisationsscreens                   | Qiagen, Hilden, Deutschland                |

#### 3.4.2 Kommerzielle Enzyme

##### Restriktionsendonukleasen:

|       |                     |
|-------|---------------------|
| BamHI | New England Biolabs |
| EcoRI | New England Biolabs |
| NcoI  | New England Biolabs |

|       |                     |
|-------|---------------------|
| NdeI  | New England Biolabs |
| NotI  | New England Biolabs |
| PstI  | New England Biolabs |
| SacI  | New England Biolabs |
| SacII | New England Biolabs |
| XhoI  | New England Biolabs |
| XmaI  | New England Biolabs |

#### Weitere Enzyme:

|                             |                             |
|-----------------------------|-----------------------------|
| Desoxyribonuclease I        | Roche, Mannheim,<br>Germany |
| Desoxyribonuclease II       | Roth                        |
| Ribonuclease A              | Sigma                       |
| Shrimp Alkaline Phosphatase | New England Biolabs         |
| Taq-DNA-Polymerase          | Amersham Biosciences        |
| T4 Ligase                   | New England Biolabs         |
| Lysozym                     | Roth                        |
| Vent-Polymerase             | New England Biolabs         |
| Strep-Tactin Antikörper     | IBA, Göttingen              |

### 3.5 Primer und Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer, die für Klonierungsarbeiten, ortsgerichtete Mutagenese, *in vitro* Transkriptionsexperimente, DNaseI Footprint Analysen, Kristallisationsexperimente oder Amplifikation spezifischer DNA für ChAP (Chromatin affinity purification) Experimente eingesetzt wurden, sind in der folgenden Tabelle 1 mit ihrer Sequenz und eventuell vorhandenen Schnittstellen und Modifikationen aufgeführt.

**Tabelle 1:** In dieser Arbeit verwendete Primer und Oligonukleotide

| Primer   | Sequenz                                     | Modifikation              |
|--|---|---------------------------|
| <b><u>Primer für ortsgerichtete Mutagenese des Fnrs aus <i>B. subtilis</i>:</u></b>                        |   |                           |
| IG21   | 5´-TGACATCT <b>GCC</b> GGAAAAGACCTGAC-3´    | (Asp63Ala) <sup>*4</sup>  |
| IG22   | 5´-GTCAGGTCTTTTCC <b>GGC</b> AGATGTCA-3´    | (Asp63Ala) <sup>*4</sup>  |
| IG23   | 5´-CAAAAGCAT <b>GCT</b> ATCGTCGGAGAATTA-3´  | (Asp76Ala) <sup>*4</sup>  |
| IG24   | 5´-TAATTCTCCGACGAT <b>AGC</b> ATGCTTTTG-3´  | (Asp76Ala) <sup>*4</sup>  |
| IG25   | 5´-AGTACTAGAG <b>GCT</b> TGGCGAGGTGCTCGT-3´ | (Asp99Ala) <sup>*4</sup>  |
| IG26   | 5´-ACGAGCACCTCGCC <b>AGC</b> CTGCTAGTACT-3´ | (Asp99Ala) <sup>*4</sup>  |
| IG27   | 5´-CAGTCCAAAATCAGG <b>GCT</b> CTGCTTCTTC-3´ | (Asp141Ala) <sup>*4</sup> |
| IG28   | 5´-GAAGAAGCAG <b>AGC</b> CCTGATTTTGGACTG-3´ | (Asp141Ala) <sup>*4</sup> |
| IGD141C  | 5´-CCAAAATCAGG <b>TGT</b> CTGCTTCT-3´       | (Asp141Cys) <sup>*4</sup> |
| IGD141C  | 5´-AGAAGCAG <b>AC</b> ACCTGATTTTGG-3´       | (Asp141Cys) <sup>*4</sup> |
| EH196  | 5´-GGCGCTCTAT <b>GCT</b> ACCCTTATCC-3       | (Ser153Ala) <sup>*4</sup> |
| EH197  | 5´-GGATAAGGGT <b>AGC</b> ATAGAGCGCC-3´      | (Ser153Ala) <sup>*4</sup> |
| EH200  | 5´-CTATTCTACC <b>GCT</b> ATCCGCTTAT-3´      | (Leu155Ala) <sup>*4</sup> |
| EH201  | 5´-ATAAGCGGAT <b>AGC</b> GGTAGAATAG-3´      | (Leu155Ala) <sup>*4</sup> |
| EH204  | 5´-TACCCTTATC <b>GCT</b> TTATCAAACA-3´      | (Arg157Ala) <sup>*4</sup> |
| EH205  | 5´-TGTTTGATAA <b>AGC</b> GATAAGGGTA-3       | (Arg157Ala) <sup>*4</sup> |
| EH265  | 5´-ACATCTGAC <b>GCA</b> AAAAGACCTG-3´       | (Gly64Ala) <sup>*4</sup>  |
| EH266  | 5´-CAGGTCTTT <b>TGC</b> GTGAGATGT-3´        | (Gly64Ala) <sup>*4</sup>  |
| IG59-R189V   | 5´-GCGGCCTGCAG <b>TG</b> GAAAGCGTCA-3´      | (Arg189Val) <sup>*4</sup> |
| IG60-R189V   | 5´-TGACGCTTTCC <b>ACT</b> GCAGCCGC-3        | (Arg189Val) <sup>*4</sup> |
| IG61-E190A   | 5´-GCTGCACGG <b>GCA</b> AGCGTCAATC-3´       | (Glu190Ala) <sup>*4</sup> |
| IG62-E190A   | 5´-GATTGACGCT <b>TGCC</b> CGTGCAGC-3´       | (Glu190Ala) <sup>*4</sup> |
| <b><u>Primer zur Klonierung des FnrCCC aus <i>B. subtilis</i> in verschiedene Expressionsvektoren:</u></b> |   |                           |
| IG34   | 5´-CG <b>GGATCC</b> TCAGTCAATATTGCAAATC-3´  | (BamHI) <sup>*1</sup>     |
| IG35   | 5´-GGAATTCC <b>CATATG</b> AATTTTCTCTGTTC-3´ | (NdeI) <sup>*1</sup>      |

|       |  |                       |
|-------|--|-----------------------|
| IG32  | 5' -CATGG <b>CCATGG</b> CTATGAATTTTCTCTCTGT-3'         | (NcoI) <sup>*1</sup>  |
| IG38  | 5' -TCCCC <b>CCCGGG</b> ATGAATTTTCTCTCTGTTC-3'         | (XmaI) <sup>*1</sup>  |
| IG31  | 5' -TCCC <b>CGCGG</b> TATGAATTTTCTCTCTGTTCG-3'         | (SacII) <sup>*1</sup> |
| EH185 | 5' -AGACCGCGGTATGAATTTTCTCTCTGTTCGACCATCTG-3'          | (SacII) <sup>*1</sup> |
| HR39  | 5' -TCTGCCTCCTCATCCTCTTCATC-3'                         |                       |
| HR52  | 5' -AAG <b>GAATT</b> CGATGAATTTTCTCTCTGTTCGACCATCTG-3' | (EcoRI) <sup>*1</sup> |

**Primer zur Klonierung des FnrCCCC aus *G. stearothermophilus* in verschiedene Expressionsvektoren:**

|      |  |                       |
|------|--|-----------------------|
| IG36 | 5' - <b>CGGGATCCT</b> CAGTCAATGCGGCACAGC-3'    | (BamHI) <sup>*1</sup> |
| IG37 | 5' -GGAATT <b>CCATAT</b> GAACGAGATTGAATCTC-3'  | (NdeI) <sup>*1</sup>  |
| IG33 | 5' -CATGG <b>CCATGG</b> CTATGAACGAGATTGAATC-3' | (NcoI) <sup>*1</sup>  |
| IG29 | 5' -CCG <b>CTCGAG</b> TCAGTCAATGCGGCACAG-3'    | (XhoI) <sup>*1</sup>  |
| IG39 | 5' -TCCCC <b>CCCGGG</b> ATGAACGAGATTGAATC-3'   | (XmaI) <sup>*1</sup>  |
| IG30 | 5' -TCCC <b>CGCGG</b> TATGAACGAGATTGAATC-3'    | (SacII) <sup>*1</sup> |

**Primer zur Klonierung von ResD und ResE aus *B. subtilis* in pET52b:**

|       |   |                      |
|-------|---|----------------------|
| EH267 | 5' -TCCCC <b>CCCGGG</b> ATGGACCAAACGAACGAAAC-3' | (XmaI) <sup>*1</sup> |
| EH268 | 5' -AC <b>GAGCTC</b> TCATTTCAGCGCCGACCTCAA-3'   | (SacI) <sup>*1</sup> |
| EH269 | 5' -TCCCC <b>CCCGGG</b> GGTGAAGTGGCGACC-3'      | (XmaI) <sup>*1</sup> |
| EH270 | 5' -AC <b>GAGCTC</b> AGTCAGCGGGTGTTC-3'         | (SacI) <sup>*1</sup> |

**Primer zur Klonierung von Rex-Strep und Strep-Fnr in den Vektor pBQ200:**

|       |   |                           |
|-------|---|---------------------------|
| IG41  | 5'-TTT <b>CTGCAG</b> CTATTATCAGTCAATATTGCAAAT-3'                                    | (PstI) <sup>*1</sup>      |
| IG42  | 5'-<br>ACG <b>CGGATCCA</b> ATCTCAAAATGAGATAGATGGATGTGAGACAA<br>ACATGTGGAGC-3'       | (BamHI) <sup>*1, *3</sup> |
| EH213 | 5'-<br>ACG <b>CGGATCCA</b> ATCTCAAAATGAGATAGATGGATGTGAGACAA<br>ACATGAATAAGGATCAA-3' | (BamHI) <sup>*1</sup>     |
| EH214 | 5'-<br>TTT <b>CTGCAG</b> CTATTATTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCATTCG<br>ATTTCTCTAAACTG-3'    | (PstI) <sup>*1, *3</sup>  |

**Oligonukleotide für die Kristallisation:**

|            |                                      |
|------------|--------------------------------------|
| hs18bp     | 5' -GCAGAGTGTGTGACATAT-3'            |
| hs13bp     | 5' -GTCACACACTCTG-3'                 |
| fs29bp_fw  | 5' -CAGAGTGTGTGACATAGTTCACAAGGAAA-3' |
| fs29bp_rev | 5' -TTTCCTTGTGAACTATGTCACACACTCTG-3' |

**Oligonukleotide zur Herstellung der Promotorkonstrukte *narK* und *ywcJ*:**

*narK* (-52 bis +3 relativ zum Transkriptionsstartpunkt) + Konstrukte mit Deletion von 12 Basenpaaren:

|       |  |                              |
|-------|--|------------------------------|
| EH273 | 5' -<br>CCG <b>GAATTC</b> ACGTGTGATGTAATTCACAATCCTGTTTGGCT<br>AGTTTTTGTATGATAAGACTGAT <b>GGATCC</b> GCG-3' | (BamHI, EcoRI) <sup>*1</sup> |
| EH274 | 5' -<br>CGCG <b>GGATCC</b> ATCAGTCTTATCATACAAAACTAGCCAAACA<br>GGATTGTGAATTACATCACACGT <b>GAATTC</b> CGG-3' | (BamHI, EcoRI) <sup>*1</sup> |
| EH275 | 5' -<br>CCG <b>GAATTC</b> ACGTGTGATGTAATTCACAATCCTTTTGTATG<br>ATAAGACTGAT <b>GGATCC</b> GCG-3'             | (BamHI, EcoRI) <sup>*1</sup> |
| EH276 | 5' -<br>CGCG <b>GGATCC</b> ATCAGTCTTATCATACAAAAGGATTGTGAATT<br>ACATCACACGT <b>GAATTC</b> CGG-3'            | (BamHI, EcoRI) <sup>*1</sup> |

*ywcJ* (-75 und -90 bis +3 relativ zum Transkriptionsstartpunkt) + Konstrukte mit Insertion von 12 Basenpaaren:

|       |   |                              |
|-------|---|------------------------------|
| EH230 | 5' -CCG <b>GAATTC</b> TTGATATAACATGTAGAC-3'   | (EcoRI) <sup>*1</sup>        |
| EH279 | 5' -<br>CCG <b>GAATTC</b> CAATTAATTGTGAAATACTTCACAATATCGTGT<br>TTGGCTAGTTGCCATACTATGCTCAAT <b>GGATCC</b> GCG-3' | (BamHI, EcoRI) <sup>*1</sup> |
| EH280 | 5' -<br>CGCG <b>GGATCC</b> ATTGAGCATAGTATGGCAACTAGCCAAACACG<br>ATATTGTGAAGTATTTTACAATTAATT <b>GAATTC</b> CGG-3' | (BamHI, EcoRI) <sup>*1</sup> |
| EH295 | 5' -<br>CCG <b>GAATTC</b> TTGATATAACATGTAGACAAAAATTCGTAAAA<br>ATTAATTGTGAAATACT-3'                              | (EcoRI) <sup>*1</sup>        |
| EH296 | 5' -CCG <b>GAATTC</b> TTTTAGTTAAATAGTTTGTATATAACAT-<br>3'   | (EcoRI) <sup>*1</sup>        |
| EH299 | 5' -CGCG <b>GGATCC</b> ATTGAGCATAGTATAGCA-3'  | (BamHI) <sup>*1</sup>        |

**Primer zur Amplifikation der Spezifischen DNA für Chap-PCR:**

|               |                             | Position relativ<br>zum<br>Transkriptions-<br>startpunkt |
|---------------|-----------------------------|--|
| IG52-ldh-fwd  | 5'-AAGGCTAGACGGGACTTACC-3'  | -113   |
| IG53-ldh-rev  | 5'-CATCCTTGCAGGGTATGTTTC-3' | +55  |
| IG50-ywcJ-fwd | 5'-CCAGTCACAATCCCGCTTAT-3'  | -166   |
| IG51-ywcJ-rev | 5'-CCTCCGTAAGCAATCATCAG-3'  | +263   |
| IG48-alsS-fwd | 5'-GCGAATCGATATTGGAGGTC-3'  | -48  |
| IG49-alsS-rev | 5'-CCGGTCCTGATGTGACTAAC-3'  | +313   |
| IG46-arfM-fwd | 5'-ATTACCCTCCTGATAAGTGAC-3' | -85  |
| IG47-arfM-rev | 5'-GACCCTTCAGGGAGCCTTGT-3'  | +231   |
| IG44-narK-fwd | 5'-AAGTCTTCGGGCTTTGTCCT-3'  | -87  |
| IG45-narK-rev | 5'-TCACAGGAATCGCGGTCCTAA-3' | +188   |
| IG42-narG-fwd | 5'-GAACGCAGCCTTCCTTCTCC-3'  | -102   |
| IG43-narG-rev | 5'-GCGGGTAGTTTGGCTATGTT-3'  | +123   |
| IG57          | 5'-AAGCAGTACAGTCCGGATTG-3'  | +38  |
| IG58          | 5'-TGGCCTGGATAACGGTTAAG-3'  | +375   |

**Primer zur Amplifikation der Promotorfragmente für die DNaseI Footprint Analysen:**

|                     |  |      |
|---------------------|--|------|
| EH20 <sup>*2</sup>  | 5'-CG <b>GAATTC</b> GCCTGCTTTACCAGTCAC -3' (EcoRI) <sup>*1</sup> | -176 |
| EH21 <sup>*2</sup>  | 5'-GC <b>GGATCC</b> AACGGAGAATCAGCCATA-3' (BamHI) <sup>*1</sup>  | +202 |
| EH174               | 5'-GAGAGGAGGCTGCGTCATGTT-3'                                      | -200 |
| EH175 <sup>*2</sup> | 5'-CCTCACTCCTTATTATGCATT-3'                                      | +51  |
| EH176 <sup>*2</sup> | 5'-AGCCCGGTTCTTAAATAGAG-3'                                       | -210 |
| EH177 <sup>*2</sup> | 5'-GATCCTCGCGGGTAGTTTGG-3'                                       | +100 |
| EH178 <sup>*2</sup> | 5'-CAGCTGATCGGCGTATCGGC-3'                                       | -140 |
| EH179 <sup>*2</sup> | 5'-CATAAACCTGCCACCAAGC-3'  | +94  |
| EH180 <sup>*2</sup> | 5'-TCGGGCTTAAGCGTTCTCT-3'  | -147 |
| EH181 <sup>*2</sup> | 5'-TCTGTGATCCCTTGGTTAAT-3'                                       | +153 |

|                     |                             |      |
|---------------------|-----------------------------|------|
| EH234 <sup>*2</sup> | 5'-CTGTTTGATCTGCTGGCTGAG-3' | -218 |
| EH235               | 5'-CGCCCCTCTGTTTTTCACAAG-3' | +105 |

**Oligonukleotide für die *in vitro* Transkription:**

|       |                                  |      |
|-------|----------------------------------|------|
| EH19  | 5' -GGTATCTGCATACATCAC-3'        | -210 |
| HR118 | 5' -AAACAACGGACTCCTTTTCTTTTCT-3' | +62  |

<sup>\*1</sup> Restriktionsschnittstellen hervorgehoben

<sup>\*2</sup> sowohl unmarkiert, als auch mit Digoxigenin (Dig) markiert

<sup>\*3</sup> der Strep-Tag ist als Anhang unterstrichen

<sup>\*4</sup> mutierte Basen hervorgehoben

### 3.6 Bakterienstämme und Vektoren

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgeführt.

**Tabelle 2:** In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

| Stamm  | Genotyp   | Referenz  |
|--|---|---|
| <b><u>Escherichia coli Klonierungsstamm:</u></b> |   |   |
| DH10b  | <i>F-mcrA_(mrr-hsdRMS-mrcBC)_80dlacZ_M15_lacX74 deoR recA1endA1 araD139_(ara, leu) 7697 galU galK_- rpsL nupG</i>   | Gibco®BRL<br>Invitrogen,<br>Karlsruhe,<br>Deutschland |
| XL 10-Gold                                       | <i>endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet<sup>R</sup> F'[proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10(Tet<sup>R</sup> Amy Cm<sup>R</sup>)]</i> | Stratagene,<br>La Jolla,<br>USA                       |
| <b><u>Escherichia coli Expressionsstamm:</u></b> |   |   |
| BL21CD+(DE3)-RIL                                 | <i>F- ompT hsdS(rB- mB-) dcm+ Tetr gal_ (DE3) endA Hte[argU ileY leuW Cm]</i>   | Stratagene,<br>La Jolla,<br>USA                       |
| <b><u>Bacillus subtilis:</u></b>                 |   |   |
| MH5636   | <i>trpC2 pheA cat 6His-rpoC (Cml)</i>   | BGSC*<br>Sun <i>et al.</i><br>1996                    |



|                       |  |                                     |
|-----------------------|--|-------------------------------------|
| HRB3                  | <i>trpC2 pheA1 fnr::sp narG-lacZ</i> (Cml)   | Reents, Diss.<br>2005               |
| HRB3 <i>fnr</i>       | <i>trpC2 pheA1 fnr::sp narG-lacZ</i> (Cml) <i>amyE::xylR/A fnr</i> (Kan)                                 | Reents, Diss.<br>2005               |
| HRB3 <i>fnr</i> D63A  | <i>trpC2 pheA1 fnr::sp narG-lacZ</i> (Cml) <i>amyE::xylR/A fnr</i> D63A (Kan)                            | diese Arbeit                        |
| HRB3 <i>fnr</i> D76A  | <i>trpC2 pheA1 fnr::Spc<sup>r</sup> narG-lacZ</i> (Cml) <i>amyE::xylR/A fnr</i> D76A (Kan) <sup>r</sup>  | diese Arbeit                        |
| HRB3 <i>fnr</i> D99A  | <i>trpC2 pheA1 fnr::Spc<sup>r</sup> narG-lacZ</i> (Cml) <i>amyE::xylR/A fnr</i> D99A(Kan) <sup>r</sup>   | diese Arbeit                        |
| HRB3 <i>fnr</i> D141A | <i>trpC2 pheA1 fnr::Spc<sup>r</sup> narG-lacZ</i> (Cml) <i>amyE::xylR/A fnr</i> D141A (Kan) <sup>r</sup> | diese Arbeit                        |
| HRB3 <i>fnr</i> D141C | <i>trpC2 pheA1 fnr::Spc<sup>r</sup> narG-lacZ</i> (Cml) <i>amyE::xylR/A fnr</i> D141C (Kan) <sup>r</sup> | diese Arbeit                        |
| HRB3 <i>fnr</i> S153A | <i>trpC2 pheA1 fnr::Spc<sup>r</sup> narG-lacZ</i> (Cml) <i>amyE::xylR/A fnr</i> S153A (Kan) <sup>r</sup> | Frädrich,<br>Bachelorarbeit<br>2007 |
| HRB3 <i>fnr</i> L155A | <i>trpC2 pheA1 fnr::Spc<sup>r</sup> narG-lacZ</i> (Cml) <i>amyE::xylR/A fnr</i> L155A (Kan) <sup>r</sup> | Frädrich,<br>Bachelorarbeit<br>2007 |
| HRB3 <i>fnr</i> R157A | <i>trpC2 pheA1 fnr::Spc<sup>r</sup> narG-lacZ</i> (Cml) <i>amyE::xylR/A fnr</i> R157A (Kan) <sup>r</sup> | Frädrich,<br>Bachelorarbeit<br>2007 |
| HRB3 <i>fnr</i> G64A  | <i>trpC2 pheA1 fnr::Spc<sup>r</sup> narG-lacZ</i> (Cml) <i>amyE::xylR/A fnr</i> G64A (Kan) <sup>r</sup>  | diese Arbeit                        |
| HRB3 <i>fnr</i> R189V | <i>trpC2 pheA1 fnr::Spc<sup>r</sup> narG-lacZ</i> (Cml) <i>amyE::xylR/A fnr</i> R189V (Kan) <sup>r</sup> | diese Arbeit                        |
| HRB3 <i>fnr</i> E190A | <i>trpC2 pheA1 fnr::Spc<sup>r</sup> narG-lacZ</i> (Cml) <i>amyE::xylR/A fnr</i> E190A (Kan) <sup>r</sup> | diese Arbeit                        |
| JH642                 | <i>trpC2 pheA1</i>   | BGSC*, 1A96                         |
| IGB1                  | <i>trpC2 pheA1 amyE::-53narKlacZ</i> (Cml)   | diese Arbeit                        |
| IGB2                  | <i>trpC2 pheA1 amyE::-53(+Deletion von 12 Basenpaaren)narKlacZ</i> (Cml)                                 | diese Arbeit                        |
| IGB3                  | <i>trpC2 pheA1 amyE::-75 ywcJlacZ</i> (Cml)  | diese Arbeit                        |
| IGB4                  | <i>trpC2 pheA1 amyE::-75(+Insertion von 12 Basenpaaren)ywcJlacZ</i> (Cml)                                | diese Arbeit                        |
| IGB5                  | <i>trpC2 pheA1 amyE::-90ywcJlacZ</i> (Cml)   | diese Arbeit                        |

|        |   |                             |
|--------|---|-----------------------------|
| IGB6   | <i>trpC2 pheA1 amyE::</i> -90(+Insertion von 12 Basenpaaren) <i>ywcJlacZ</i> (Cml)                        | diese Arbeit                |
| THB2   | <i>trpC2 pheA1 fnr::spc</i> (Sp)  | Hoffmann <i>et al.</i> 1995 |
| IGB7   | <i>trpC2 pheA1 fnr::spc amyE::</i> -53 <i>narKlacZ</i> (Sp, Cml)  | diese Arbeit                |
| IGB8   | <i>trpC2 pheA1 fnr::spc amyE::</i> -53(+Deletion von 12 Basenpaaren) <i>narKlacZ</i> (Sp, Cml)            | diese Arbeit                |
| IGB9   | <i>trpC2 pheA1 fnr::spc amyE::</i> -75 <i>ywcJlacZ</i> (Sp, Cml)  | diese Arbeit                |
| IGB10  | <i>trpC2 pheA1 fnr::spc amyE::</i> -75(+Insertion von 12 Basenpaaren) <i>ywcJlacZ</i> (Sp, Cml)           | diese Arbeit                |
| IGB11  | <i>trpC2 pheA1 fnr::spc amyE::</i> -90 <i>ywcJlacZ</i> (Sp, Cml)  | diese Arbeit                |
| IGB12  | <i>trpC2 pheA1 fnr::spc amyE::</i> -90(+Insertion von 12 Basenpaaren) <i>ywcJlacZ</i> (Sp, Cml)           | diese Arbeit                |
| IGB13  | <i>trpC2 pheA1 rex::kan</i> (Kan)   | Anja Hartmann 2005          |
| IGB14  | <i>trpC2 pheA1 rex::kan amyE::</i> -53 <i>narKlacZ</i> (Kan, Cml)   | diese Arbeit                |
| IGB15  | <i>trpC2 pheA1 rex::kan amyE::</i> -53(+Deletion von 12 Basenpaaren) <i>narKlacZ</i> (Kan, Cml)           | diese Arbeit                |
| IGB16  | <i>trpC2 pheA1 rex::kan amyE::</i> -75 <i>ywcJlacZ</i> (Kan, Cml)   | diese Arbeit                |
| IGB17  | <i>trpC2 pheA1 rex::kan amyE::</i> -75 (+Insertion von 12 Basenpaaren) <i>ywcJlacZ</i> (Kan, Cml)         | diese Arbeit                |
| IGB18  | <i>trpC2 pheA1 rex::kan amyE::</i> -90 <i>ywcJlacZ</i> (Kan, Cml)   | diese Arbeit                |
| IGB19  | <i>trpC2 pheA1 rex::kan amyE::</i> -90 (+Insertion von 12 Basenpaaren) <i>ywcJlacZ</i> (Kan, Cml)         | diese Arbeit                |
| MH5081 | <i>trpC2 pheA1 resDE::pRC22 tet</i> (Tet)   | Sun <i>et al.</i> , 1996b   |
| IGB20  | <i>trpC2 pheA1 resDE::pRC22 tet amyE::</i> -75 <i>ywcJlacZ</i> (Kan, Cml)                                 | diese Arbeit                |
| IGB21  | <i>trpC2 pheA1 resDE::pRC22 tet amyE::</i> -75 (+Insertion von 12 Basenpaaren) <i>ywcJlacZ</i> (Kan, Cml) | diese Arbeit                |
| IGB22  | <i>trpC2 pheA1 resDE::pRC22 tet amyE::</i> -90 <i>ywcJlacZ</i> (Kan, Cml)                                 | diese Arbeit                |
| IGB23  | <i>trpC2 pheA1 resDE::pRC22 tet amyE::</i> -90 (+Insertion von 12 Basenpaaren) <i>ywcJlacZ</i> (Kan, Cml) | diese Arbeit                |
| IGB24  | <i>trpC2 pheA1 fnr::spc narG-lacZ</i> + <i>pBQstrepfnr</i> (Cml, Sp, Lm, Ery)                             | diese Arbeit                |

|       |   |                       |
|-------|---|-----------------------|
| IGB25 | <i>trpC2 pheA1 rex::kan amyE::ywcJ-lacZ</i> (Cml, Kan)                          | Anja Hartmann<br>2005 |
| IGB26 | <i>trpC2 pheA1 rex::kan amyE::ywcJ-lacZ+ pBQrexstrep</i><br>(Cml, Kan, Lm, Ery) | diese Arbeit          |

\* *Bacillus* Genetic Stock Center

**Tabelle 3:** In dieser Arbeit verwendete Vektoren.

| Vektor  | relevante Charakteristika   | Referenz                              |
|---|---|---------------------------------------|
| pASK-IBA-13plus                                 | <i>strep</i> (Amp)  | IBA,<br>Göttingen,<br>Deutschland     |
| pASK-IBA-13plus <i>fnrCCC</i>                   | pASK-IBA-13plus ( <i>strep</i> ) + <i>B.subtilisfnrCys72Ala Cys185Ala Cys223Ala</i>                   | diese Arbeit                          |
| pASK-IBA-43plus                                 | (Amp) <i>6xhis</i>  | IBA,<br>Göttingen,<br>Deutschland     |
| pASK-IBA-43plus <i>fnrCCC</i>                   | pASK-IBA-43plus ( <i>6xhis</i> ) + <i>B.subtilisfnrCys72Ala Cys185Ala Cys223Ala</i> (Amp)             | diese Arbeit                          |
| pASK-IBA-43plus <i>fnrCCCC<sub>stearo</sub></i> | pASK-IBA-43plus ( <i>6xhis</i> ) + <i>G.stearofnrCys63Ala Cys76Ala Cys150Ala Cys176Ala 2045</i> (Amp) | diese Arbeit                          |
| pET-5a  | (Amp)   | Novagen,<br>Darmstadt,<br>Deutschland |
| pET-5a <i>fnrCCC</i>                            | pET-5a + <i>B.subtilisfnrCys72Ala Cys185Ala Cys223Ala</i> (Amp)                                       | diese Arbeit                          |
| pET-5a <i>fnrCCCC<sub>stearo</sub></i>          | pET-5a + <i>G.stearofnrCys63Ala Cys76Ala Cys150Ala Cys176Ala 2045</i> (Amp)                           | diese Arbeit                          |
| pET-32a   | <i>trx, his, s</i> (Amp)  | Novagen,<br>Darmstadt,<br>Deutschland |
| pET-32a <i>fnrCCC</i>                           | pET-32a ( <i>trx, his, s</i> ) + <i>B.subtilisfnrCys72Ala Cys185Ala Cys223Ala</i> (Amp)               | diese Arbeit                          |
| pET-32a <i>fnrCCCC<sub>stearo</sub></i>         | pET-32a ( <i>trx, his, s</i> ) + <i>G.stearofnrCys63Ala Cys76Ala Cys150Ala Cys176Ala 2045</i> (Amp)   | diese Arbeit                          |
| pET-52b   | <i>strep</i> (Amp)  | Novagen,<br>Darmstadt,<br>Deutschland |

|   |  |                                     |
|---|--|-------------------------------------|
| pET-52b <i>fnr</i> CCC                    | pET-52b ( <i>strep</i> ) + <i>B.subtilisfnr</i> Cys72Ala Cys185Ala Cys223Ala (Amp)             | diese Arbeit                        |
| pET-52b <i>fnr</i> CCCC <sub>stearo</sub> | pET-52b ( <i>strep</i> ) + <i>G.stearofnr</i> Cys63Ala Cys76Ala Cys150Ala Cys176Ala 2045 (Amp) | diese Arbeit                        |
| pET-52b <i>resD</i>                       | pET-52b ( <i>strep</i> ) + <i>resD</i> (Amp)   | diese Arbeit                        |
| pET-52b <i>resE</i> *                     | pET-52b ( <i>strep</i> ) + N-terminal deletiertes <i>resE</i> (Amp)                            | diese Arbeit                        |
| pASK-IBA45plus                            | <i>strep</i> (Amp)   | IBA,<br>Göttingen,<br>Deutschland   |
| pHRB2 <i>fnr</i>                          | pASK-IBA45plus ( <i>strep</i> ) + <i>fnr</i> (Amp)   | Reents, Diss.<br>2005               |
| pHRB2 <i>fnr</i> CCC                      | pASK-IBA45plus ( <i>strep</i> ) + <i>fnr</i> C72A C185A C223A (Amp)                            | Reents, Diss.<br>2005               |
| pHRB2 <i>fnr</i> D63A                     | pASK-IBA45plus ( <i>strep</i> ) + <i>fnr</i> D63A (Amp)  | diese Arbeit                        |
| pHRB2 <i>fnr</i> D141A                    | pASK-IBA45plus ( <i>strep</i> ) + <i>fnr</i> D141A (Amp)                                       | diese Arbeit                        |
| pHRB2 <i>fnr</i> D141C                    | pASK-IBA45plus ( <i>strep</i> ) + <i>fnr</i> D141C (Amp)                                       | diese Arbeit                        |
| pHRB2 <i>fnr</i> S153A                    | pASK-IBA45plus ( <i>strep</i> ) + <i>fnr</i> S153A (Amp)                                       | Frädrich,<br>Bachelorarbeit<br>2007 |
| pHRB2 <i>fnr</i> L155A                    | pASK-IBA45plus ( <i>strep</i> ) + <i>fnr</i> L155A (Amp)                                       | Frädrich,<br>Bachelorarbeit<br>2007 |
| pHRB2 <i>fnr</i> R157A                    | pASK-IBA45plus ( <i>strep</i> ) + <i>fnr</i> R157A (Amp)                                       | Frädrich,<br>Bachelorarbeit<br>2007 |
| pHRB21 <i>fnr</i> G64A                    | pASK-IBA45plus ( <i>strep</i> ) + <i>fnr</i> G64A (Amp)  | diese Arbeit                        |
| pHRB2 <i>fnr</i> R189V                    | pASK-IBA45plus ( <i>strep</i> ) + <i>fnr</i> R189V (Amp)                                       | diese Arbeit                        |
| pHRB2 <i>fnr</i> E190A                    | pASK-IBA45plus ( <i>strep</i> ) + <i>fnr</i> E190A (Amp)                                       | diese Arbeit                        |
| pHRB1                                     | <i>amyE::xylR/A</i> (Kan, Amp)   | Reents, Diss.<br>2005               |
| pHRB1 <i>fnr</i>                          | pHRB1( <i>amyE::xylR/A</i> ) + <i>fnr</i> (Kan, Amp)   | Reents, Diss.<br>2005               |
| pHRB1 <i>fnr</i> CCC                      | pHRB1( <i>amyE::xylR/A</i> ) + <i>fnr</i> Cys72Ala Cys185Ala Cys223Ala (Kan, Amp)              | Reents, Diss.<br>2005               |
| pHRB1 <i>fnr</i> D63A                     | pHRB1( <i>amyE::xylR/A</i> )+ <i>fnr</i> D63A (Kan, Amp)                                       | diese Arbeit                        |
| pHRB1 <i>fnr</i> D76A                     | pHRB1( <i>amyE::xylR/A</i> ) + <i>fnr</i> D76A (Kan, Amp)                                      | diese Arbeit                        |
| pHRB1 <i>fnr</i> D99A                     | pHRB1( <i>amyE::xylR/A</i> ) + <i>fnr</i> D99A (Kan, Amp)                                      | diese Arbeit                        |

|                            |   |  |
|----------------------------|---|--|
| pHRB1 <i>fnr</i> D141A     | pHRB1( <i>amyE::xylR/A</i> ) + <i>fnr</i> D141A (Kan, Amp)  | diese Arbeit                               |
| pHRB1 <i>fnr</i> D141C     | pHRB1( <i>amyE::xylR/A</i> ) + <i>fnr</i> D141C (Kan, Amp)  | diese Arbeit                               |
| pHRB1 <i>fnr</i> S153A     | pHRB1( <i>amyE::xylR/A</i> ) + <i>fnr</i> S153A (Kan, Amp)  | Frädrich,<br>Bachelorarbeit<br>2007        |
| pHRB1 <i>fnr</i> L155A     | pHRB1( <i>amyE::xylR/A</i> ) + <i>fnr</i> L155A (Kan, Amp)  | Frädrich,<br>Bachelorarbeit<br>2007        |
| pHRB1 <i>fnr</i> R157A     | pHRB1( <i>amyE::xylR/A</i> ) + <i>fnr</i> R157A (Kan, Amp)  | Frädrich,<br>Bachelorarbeit<br>2007        |
| pHRB1 <i>fnr</i> G64A      | pHRB1( <i>amyE::xylR/A</i> ) + <i>fnr</i> G64A (Kan, Amp)   | diese Arbeit                               |
| pHRB1 <i>fnr</i> R189V     | pHRB1( <i>amyE::xylR/A</i> ) + <i>fnr</i> R189V (Kan, Amp)  | diese Arbeit                               |
| pHRB1 <i>fnr</i> E190A     | pHRB1( <i>amyE::xylR/A</i> ) + <i>fnr</i> E190A (Kan, Amp)  | diese Arbeit                               |
| pBQ200                     | <i>degQ36</i> (Amp, Lm, Ery)  | Martin-<br>Verstraete <i>et al.</i> , 1994 |
| pBQstrep <i>fnr</i>        | pBQ200 ( <i>degQ36</i> ) + <i>strepfnr</i> (Amp, Lm, Ery)   | diese Arbeit                               |
| pBQrexstrep                | pBQ200 ( <i>degQ36</i> ) + <i>rexstrep</i> (Amp, Lm, Ery)   | diese Arbeit                               |
| pDia5322                   | <i>amyE::lacZ</i> , (Amp, Cml)  | Cruz Ramos <i>et al.</i> 1995              |
| p-53(wt) <i>nark-lacZ</i>  | pDia5322 ( <i>amyE::lacZ</i> ) + 56 bp <i>nark</i> -<br>Promotorfragment (-53 - +3 relativ zum<br>Transkriptionsstartpunkt) (Amp, Cml)                                    | diese Arbeit                               |
| p-53(-12) <i>nark-lacZ</i> | pDia5322 ( <i>amyE::lacZ</i> ) + 44 bp <i>nark</i> -<br>Promotorfragment (-53 - +3 relativ zum<br>Transkriptionsstartpunkt + Deletion von 12<br>Basenpaaren) (Amp, Cml)   | diese Arbeit                               |
| p-75(wt) <i>ywcJ-lacZ</i>  | pDia5322 ( <i>amyE::lacZ</i> ) + 78 bp <i>ywcJ</i> -<br>Promotorfragment (-75 - +3 relativ zum<br>Transkriptionsstartpunkt) (Amp, Cml)                                    | diese Arbeit                               |
| p-75(+12) <i>ywcJ-lacZ</i> | pDia5322 ( <i>amyE::lacZ</i> ) + 90 bp <i>ywcJ</i> -<br>Promotorfragment (-75 - +3 relativ zum<br>Transkriptionsstartpunkt + Insertion von 12<br>Basenpaaren) (Amp, Cml)  | diese Arbeit                               |
| p-90(wt) <i>ywcJ-lacZ</i>  | pDia5322 ( <i>amyE::lacZ</i> ) + 93 bp <i>ywcJ</i> -<br>Promotorfragment (-90 - +3 relativ zum<br>Transkriptionsstartpunkt) (Amp, Cml)                                    | diese Arbeit                               |
| p-90(+12) <i>ywcJ-lacZ</i> | pDia5322 ( <i>amyE::lacZ</i> ) + 105 bp <i>ywcJ</i> -<br>Promotorfragment (-90 - +3 relativ zum<br>Transkriptionsstartpunkt + Insertion von 12<br>Basenpaaren) (Amp, Cml) | diese Arbeit                               |
| p-75 <i>ywcJ-lacZ</i>      | pDia5322 ( <i>amyE::lacZ</i> ) + 296 bp <i>ywcJ</i> -<br>Promotorfragment (Amp, Cml)  | Nachtigall,<br>Bachelorarbeit<br>2008      |

|                 |  |                                 |
|-----------------|--|---------------------------------|
| p-90ywcJ-lacZ   | pDia5322 ( <i>amyE::lacZ</i> ) + 311 bp <i>ywcJ</i> -Promotorfragment (Amp, Cml) | Nachtigall, Bachelorarbeit 2008 |
| pGEX <i>fnr</i> | pGEX-6P1 <i>fnr</i>  | Harmening, Diplomarbeit         |
| pSLB9           | pBluescriptIIISK+ <i>B.stearofnr</i> C63A C76A C150A C176A 2045                  | Lüders, Diplomarbeit 2006       |

### 3.7 Mikrobiologische Techniken

#### 3.7.1 Sterilisation

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Medien und Puffer für 20 Minuten bei 121 °C und 1 bar Überdruck sterilisiert. Antibiotika und andere temperaturempfindliche Substanzen wurden sterilfiltriert (Porendurchmesser: 0,2 µm).

#### 3.7.2 Bakterienkultivierung auf Agarplatten

Mit einer sterilen Impföse wurden aus einer Glycerinkultur Bakterien entnommen und auf einer LB-Agar-Platte, die bei Bedarf mit einem entsprechenden Antibiotikum versetzt war, ausgestrichen. Die Platte wurde 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Bakterien aus einer Flüssigkultur wurden auf der LB-Agar-Platte mit einem Drigalski-Spatel ausgestrichen und bei 37 °C bebrütet.

##### LB-Platten:

|        |             |
|--------|-------------|
| 5 g/l  | Hefeextrakt |
| 10 g/l | Pepton      |
| 10 g/l | NaCl        |
| 15 g/l | Agar-Agar   |

#### 3.7.3 Wachstumsbedingungen für *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli*

Mit einer sterilen Impföse wurden von einer LB-Agar-Platte oder aus einer Glycerinkultur Bakterien entnommen und in ein Nährmedium überführt, welches gegebenenfalls entsprechende Antibiotika enthielt. Falls nicht anders

angegeben, wurden für aerobe Kulturen jeweils 100 ml Kultur in 300 ml Schikanekolben bzw. 5 ml Kultur in Reagenzgläsern schüttelnd (180 upm) bei 37 °C inkubiert. Anaerobe Kulturen wurden in bis zum Rand gefüllten, mit einem Septum verschlossenen Transfusionsflaschen schüttelnd (100 upm) bei 37 °C inkubiert.

**SMM-Medium (Minimalmedium):**

|                                  |          |   |
|----------------------------------|----------|---|
| SMM-Basis:                       | 2,0 mM   | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>       |
|                                  | 80,0 mM  | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                       |
|                                  | 44,0 mM  | Na <sub>3</sub> Citrat x 2 H <sub>2</sub> O           |
|                                  | 0,8 mM   | MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O                |
| 10 x SMM-Mix:                    | 0,8 mM   | L-Phenylalanin  |
|                                  | 1,0 mM   | L-Tryptophan  |
|                                  | 1,5 mM   | Thiaminchloridhydrochlorid                            |
|                                  | 50,0 mM  | D(+)-Glucose-Monohydrat                               |
|                                  | 50,0 mM  | Pyruvat   |
| 100 x SMM-Spurenelementlösung:   | 600 mg/l | CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O                |
|                                  | 1,3 g/l  | FeCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O                |
|                                  | 100 mg/l | MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O                |
|                                  | 40 mg/l  | CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O                |
|                                  | 60 mg/l  | CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O                |
|                                  | 60 mg/l  | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O |
|                                  | 170 mg/l | ZnCl <sub>2</sub>                                     |
| Casaminoacids-Lösung:            | 10,0 %   | Casaminoacids   |
| Zusammensetzung des SMM-Mediums: | 880 ml   | SMM-Basis   |
|                                  | 100 ml   | 10 x SMM-Mix  |

|    |    |                                   |
|----|----|-----------------------------------|
| 10 | ml | 100 x SMM-<br>Spurenelementlösung |
| 10 | ml | Casaminoacids-Lösung              |

**LB-Medium (Vollmedium):**

|          |             |
|----------|-------------|
| 5,0 g/l  | Hefeextrakt |
| 10,0 g/l | Pepton      |
| 10,0 g/l | NaCl        |

**3.7.4 Antibiotika**

Antibiotika wurden als konzentrierte Stammlösungen angesetzt und sterilfiltriert (Tabelle 4). Die Substanzen wurden den autoklavierten, abgekühlten Medien in folgenden Endkonzentrationen zugesetzt:

**Tabelle 4:** In dieser Arbeit verwendete Antibiotika

|                 | Konzentrat          | Endkonzentration | Organismus         |
|-----------------|---------------------|------------------|--------------------|
| Ampicillin      | 100 mg/ml in Wasser | 100 µg/ml        | <i>E. coli</i>     |
| Chloramphenicol | 34 mg/ml in Ethanol | 5 µg/ml          | <i>B. subtilis</i> |
|                 |                     | 34 µg/ml         | <i>E. coli</i>     |
| Erythromycin    | 1 mg/ml in Ethanol  | 0,4 µg/ml        | <i>B. subtilis</i> |
| Kanamycin       | 10 mg/ml in Wasser  | 5 µg/ml          | <i>B. subtilis</i> |
| Lincomycin      | 25 mg/ml in Wasser  | 25 µg/ml         | <i>B. subtilis</i> |
| Spectinomycin   | 100 mg/ml in Wasser | 60 µg/ml         | <i>B. subtilis</i> |
| Tetrazyclin     | 5 mg/ml in Ethanol  | 5 µg/ml          | <i>B. subtilis</i> |

**3.7.5 Bestimmung der Zelldichte**

Zur Bestimmung der Zelldichte einer Bakterienkultur wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 578 nm gemessen.



### 3.7.6 Anlegen von Glycerinkulturen

Zur Langzeitlagerung von Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurde LB-Medium, das die entsprechenden Antibiotika enthielt, mit einer Einzelkolonie beimpft und 16 Stunden bei 37 °C schüttelnd (180 upm) inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden zu 800 µl dieser Kultur Glycerin (Endkonz.: 20 %) zugesetzt und die Bakteriensuspension bei -80 °C eingefroren.

### 3.7.7 Test für die Integration in den *amyE*-Genlocus

Einzelkolonien wurden auf LB-Platten, die 1 % Stärke enthielten, ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. Nach 16 Stunden wurden die Platten mit Lugol'scher Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) überschichtet. Bildeten sich nach kurzer Zeit helle Höfe um die Kolonien, deutete dies auf abgebaute Stärke und folglich auf einen intakten *amyE*-Locus hin. Das Ergebnis wurde mit einer Positivkontrolle/Negativkontrolle verglichen.

#### LB-Stärke-Platten:

|        |             |
|--------|-------------|
| 5 g/l  | Hefeextrakt |
| 10 g/l | Pepton      |
| 10 g/l | NaCl        |
| 10 g/l | Stärke      |
| 15 g/l | Agar-Agar   |

### 3.7.8 Test auf Aktivität des *Fnr*s *in vivo* in *Bacillus subtilis* durch blau weiß Selektion

Einzelkolonien wurden auf LB-Platten, die X-Gal, Xylose und NaNO<sub>3</sub> enthielten, ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. Nach 16 Stunden wurden die Platten auf blaue und weiße Kolonien überprüft. Blaue Kolonien zeigten über einen Xylose abhängigen Promotor produziertes, aktives *Fnr*, welches die Expression der integrierten Reportergenfusion (*lacZ*) aktivieren konnte.

**LB-Platten mit Xylose und X-Gal:**

|         |                       |
|---------|-----------------------|
| 5 g/l   | Hefeextrakt           |
| 10 g/l  | Pepton                |
| 10 g/l  | NaCl                  |
| 10 g/l  | Stärke                |
| 15 g/l  | Agar-Agar             |
| 80 mg/l | X-Gal (in DMF gelöst) |
| 2 %     | Xylose                |
| 10 mM   | NaNO <sub>3</sub>     |

**3.8. Molekularbiologische Techniken****3.8.1 Herstellung kompetenter *Bacillus subtilis* Zellen**

Zur Herstellung kompetenter *B. subtilis* Zellen wurde der entsprechende Stamm auf einer LB-Platte ausgestrichen und 16 Stunden bei 30 °C inkubiert. Mit Zellen dieser Platte wurden 20 ml SpC-Medium inokuliert und bei 37 °C und 200 upm inkubiert. Bei Erreichen der Stationärphase wurden 2 ml der Kultur in 200 ml SpII-Medium überführt und für weitere 90 Minuten bei 140 upm und 37 °C inkubiert. Anschließend sedimentierten die Zellen bei 5000 g (5 Minuten, 4 °C). Das Sediment wurde in 6 ml des Überstands und 825 µl sterilen Glycerins (80 % v/v) resuspendiert und aliquotiert. Die kompetenten Zellen konnten nun bei -80 °C gelagert werden.

|             |          |   |
|-------------|----------|---|
| T-Base:     | 2,0 g/l  | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |
|             | 14,0 g/l | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 |
|             | 6,0 g/l  | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 |
|             | 1,0 g/l  | Na <sub>3</sub> Citrat x 7 H <sub>2</sub> O     |
| SpC-Medium: | 20,0 ml  | T-Base  |
|             | 200 µl   | 50 % (w/v) Glukose                              |
|             | 300 µl   | 1,2 % (w/v) MgSO <sub>4</sub>                   |
|             | 400 µl   | 10 % (w/v) Hefeextrakt                          |
|             | 500 µl   | 1 % (w/v) Casaminoacids                         |

|             |          |                               |
|-------------|----------|-------------------------------|
| SpII-Medium | 200,0 ml | T-Base                        |
|             | 2,0 ml   | 50 % (w/v) Glucose            |
|             | 14 ml    | 1,2 % (w/v) MgSO <sub>4</sub> |
|             | 2,0 ml   | 10 % (w/v) Hefeextrakt        |
|             | 2,0 ml   | 1 % (w/v) Casaminoacids       |
|             | 1,0 ml   | CaCl <sub>2</sub>             |

### 3.8.2 Transformation von *Bacillus subtilis* mit chromosomaler und Plasmid-DNA

Zur Transformation von *B. subtilis* mit Plasmid-DNA wurden 5 µg des entsprechenden Plasmids eingesetzt. Dazu wurde ein Aliquot von 250 µl kompetenten Zellen zunächst mit 1 Volumen SpII + EGTA gemischt. Dreihundert µl der Suspension wurden zur DNA-Lösung gegeben und schüttelnd (350 upm) bei 37 °C für 3 Stunden und weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Selektivmedium ausplattiert und 16 Stunden bei 37 °C bebrütet. Nach erfolgreicher Transformation waren Einzelkolonien auf den Platten sichtbar.

|             |          |                                       |
|-------------|----------|---------------------------------------|
| SpII + EGTA | 200,0 ml | SpII-Medium (ohne CaCl <sub>2</sub> ) |
|             | 4,0 ml   | EGTA (pH 8,0)                         |

### 3.8.3 Herstellung elektrokompenter *Escherichia coli* Zellen

Eine Übernachtskultur von 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurde mit einer Einzelkolonie beimpft. Nach Inkubation für 16 Stunden wurden 500 ml LB-Medium mit 2,5 ml der Vorkultur inokuliert und bei 37 °C schüttelnd (200 upm) inkubiert. Bei Erreichen einer OD<sub>578nm</sub> zwischen 0,5 und 0,7 wurden die Zellen in einem Zentrifugationsschritt (10 min, 5000 g, 4 °C) sedimentiert. Die folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Das Sediment wurde in 5 ml sterilem Wasser resuspendiert und anschließend mit sterilem Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Nach Zentrifugation (5000 g, 4 °C, 5 min) wurde der Überstand verworfen und der Waschschrift mit Wasser wiederholt. Anschließend wurde das Sediment in 20 ml 10%iger (v/v) Glycerinlösung resuspendiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 min, 5000 g,

4 °C). Zuletzt wurde das Sediment in 1 Volumen 10 %iger (v/v) Glycerinlösung resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

#### **3.8.4 Transformation von *Escherichia coli* mittels Elektroporation**

Die Transformation von *E. coli* Stämmen mit Plasmid-DNA erfolgte durch Elektroporation (Dower *et al.*, 1988). Dazu wurde 5 - 50 ng Plasmid-DNA zu 40 µl elektrokompenten Zellen gegeben, und die Suspension in eine Elektroporationsküvette (Spaltbreite: 2 mm) gefüllt. Für diese Elektroporation waren folgende Einstellungen des GenePulser II (BioRad, München, Deutschland) Voraussetzung:

|                            |           |    |
|----------------------------|-----------|----|
| Kapazität                  | 25,0      | µF |
| Spannung                   | 2,5       | kV |
| Widerstand                 | 200,0     | Ω  |
| Dauer des Spannungsstosses | ca. 20,0  | s  |
| Messwert                   | 4,7 - 4,8 | ms |

Danach fügte man der Zellsuspension 1 ml LB-Medium zu und inkubiert schüttelnd (200 upm) 1 Stunde bei 37 °C. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen auf LB-Platten, die entsprechende Antibiotika enthielten, ausgestrichen und nochmals bei 37 °C für 16 Stunden inkubiert. Nach erfolgreicher Transformation waren Einzelkolonien auf den Platten sichtbar.

#### **3.8.5 Herstellung chemokompetenter *Escherichia coli* Zellen**

Zur Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen (XL 10-Gold<sup>®</sup>, Stratagene) wurden 250 ml LB-Medium mit 20 mM MgSO<sub>4</sub> mit *E. coli*-Zellen beimpft. Diese wurden bei 37 °C und 180 upm inkubiert. Bei Erreichen einer OD<sub>578nm</sub> = 0,5-0,6 wurden die Zellen pelletiert (Sorvall-Zentrifuge SLA 3000, 5000 upm, 10 min, 4 °C). Das Sediment wurde in 100 ml gekühlten TFB-I Puffer resuspendiert, für 5 min auf Eis inkubiert und pelletiert (Sorvall-Zentrifuge SLA 3000, 5000 upm, 10 min, 4 °C). Anschließend wurde das Sediment in 10 ml TFB-II Puffer resuspendiert und für 60 min auf Eis inkubiert. Die chemokompetenten *E. coli*-Zellen wurden in Reaktionsgefäße zu 200 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

|         |  |                   |
|---------|--|-------------------|
| TFB-I:  | 30 mM                                    | Kaliumacetat      |
|         | 10 mM                                    | CaCl <sub>2</sub> |
|         | 50 mM                                    | MnCl <sub>2</sub> |
|         | 100 mM                                   | RbCl              |
|         | 15 % [w/v]                               | Glycerin          |
|         | mit 1 M Essigsäure pH auf 5,8 einstellen |                   |
| TFB-II: | 10 mM                                    | PIPES (pH=6,5)    |
|         | 75 mM                                    | CaCl <sub>2</sub> |
|         | 10 mM                                    | RbCl              |
|         | 15 % [v/v]                               | Glycerin          |
|         | pH mit 1 M KOH auf 6,5 einstellen        |                   |

### 3.8.6 Transformation von *Escherichia coli* mittels Chemotransformation

Zur Transformation von *E. coli* Zellen mittels Chemotransformation wurden 1 µg Plasmid-DNA mit 45 µl chemokompetenter *E. coli* Zellen vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin folgte ein Hitzeschock für 30 s bei 42 °C und eine Inkubation für 2 min auf Eis. Zu der Zellsuspension wurden 500 µl LB-Medium hinzugegeben und für 1 Stunde bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen auf LB-Platten, die entsprechende Antibiotika enthielten, ausgestrichen und nochmals bei 37 °C für 16 Stunden inkubiert. Nach erfolgreicher Transformation waren Einzelkolonien auf den Platten sichtbar.

### 3.8.7 Plasmid-Präparation

4 ml einer Übernachtskultur wurden zentrifugiert und das Sediment in 150 µl GTE-Lösung resuspendiert. Nach Inkubation für 2 min wurde der Ansatz mit 300 µl Lyse-Puffer gemischt. Anschließend wurden 225 µl Natriumacetatlösung zugegeben und der Ansatz 10 Minuten bei 13.000 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt. Die Plasmid-DNA wurde mit 600 µl Isopropanol gefällt. Nach Zentrifugation für 10 min wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 200 µl TES-Puffer resuspendiert und nach

Zugabe von 2 µl RNase-Lösung (Sambrook *et al.*, 1989) 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Extraktion mit 200 µl Chloroform wurde die Plasmid-DNA mit 400 µl Ethanol gefällt und zweimal mit 300 µl 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen. Das getrocknete Sediment wurde schließlich in 20 µl TE-Puffer gelöst.

|                      |                  |                        |
|----------------------|------------------|------------------------|
| GTE-Lösung:          | 50,0 mM          | Glukose                |
|                      | 25,0 mM          | Tris-HCl (pH 8,0)      |
|                      | 10,0 mM          | EDTA (pH 8,0)          |
| Lyse-Puffer:         | 200 mM           | NaOH                   |
|                      | 1,0 % (w/v)      | SDS                    |
| Natriumacetatlösung: | 3,0 M            | Natriumacetat (pH 4,8) |
| TES-Puffer :         | 50,0 mM          | Tris-HCl (pH 8,0)      |
|                      | 10,0 mM          | EDTA (pH 8,0)          |
|                      | 150,0 mM         | NaCl                   |
| TE-Puffer:           | 10,0 mM          | TrisHCl (pH 8,0)       |
|                      | 1,0 mM           | EDTA (pH 8,0)          |
| RNase-Lösung:        | 10 mg/ml in 50 % |                        |
|                      | Glycerol         |                        |

### 3.8.8 Präparation chromosomaler *Bacillus subtilis* DNA

Zur Präparation chromosomaler *B. subtilis* DNA wurden die Zellen einer 25 ml Übernachtskultur sedimentiert und in 4 ml Lysis-Puffer resuspendiert. Zur Suspension wurden 5 mg Lysozym (Fluka, Buchs, Schweiz) gegeben und für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 300 µl Sarkosyllösung zur weiteren Lyse hinzugegeben. Nach 5 Minuten wurden 4 ml Phenol zugegeben und für weitere 30 Minuten gemischt. Der Ansatz wurde zentrifugiert (10000 upm, 15 min, 4 °C) und die wässrige Phase in ein 15 ml Röhrchen

überführt. Es folgte eine Extraktion mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) und Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) zwischen diesen Schritten folgte jeweils eine 15 min Zentrifugationsschritt (4200 upm, 4 °C). Die wässrige Phase wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt und die chromosomale DNA mit 400 ml Natriumacetatlösung und 10 ml Ethanol gefällt. Das Präzipitat wurde wiederholt mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer gelöst.

|                      |              |                        |
|----------------------|--------------|------------------------|
| Lysis-Puffer:        | 100,0 mM     | NaCl                   |
|                      | 50,0 mM      | EDTA (pH 7,5)          |
| 20 % Sarkosyllösung: | 20,0 % (w/v) | N-Lauroylsarcosin      |
| Natriumacetatlösung: | 3,0 M        | Natriumacetat (pH 4,8) |
| TE-Puffer:           | 10,0 mM      | Tris-HCl (pH 8,0)      |
|                      | 1,0 mM       | EDTA (pH 8,0)          |

### 3.8.9 Bestimmung der Konzentration von DNA Lösungen

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Messung der Extinktion bei 260 nm. Eine Extinktion von 1 wurde dabei einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA gleichgesetzt. Die Reinheit der Lösung ergab sich aus dem Quotienten der Extinktionen, die bei 260 nm und 280 nm gemessen wurden, und sollte 1,8-2,0 betragen.

### 3.8.10 Polymerase-Kettenreaktion zur DNA-Amplifikation

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA oder genomischer DNA wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Zu 5 ng (Plasmid-DNA) oder 100 ng (genomischer DNA) Matrize wurden 5 µl 10fach Puffer, 1 µl dATP-, dCTP-, dGTP- und dTTP-Mix (Ausgangskonzentration: 10 mM) und jeweils 10 pmol der Primer gegeben. Der Ansatz wurde auf 50 µl mit sterilem, deionisiertem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde die DNA für 10 Minuten

bei 95 °C denaturiert. Nach Zugabe von 1 U Vent-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) oder Taq-Polymerase (Amersham Biosciences) wurde die PCR gestartet. Alternativ wurde die MgSO<sub>4</sub>-Konzentration in den Ansätzen zwischen 1 bis 6 mM variiert.

Das Standardprogramm der PCR setzte sich wie folgt zusammen:

|          |               |   |           |
|----------|---------------|---|-----------|
| 95 °C    | 10 min        | Initiale Denaturierung der parentalen DNA |           |
| 95 °C    | 1 min         | Denaturierung der amplifizierten dsDNA    | 25 Zyklen |
| 45-55 °C | 1 min         | Annealing der Primer                      |           |
| 72 °C    | 1 min /500 bp | Polymerisation                            |           |
| 72 °C    | 8 min         | Finale Polymerisation                     |           |

### 3.8.11 Spalten von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von Plasmid-DNA, PCR-Fragmenten und ds Oligonukleotiden erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in 50 µl Ansätzen. Es wurden 3 U der Restriktionsendonukleasen pro µg DNA eingesetzt. Die Restriktion erfolgte in dem vom Hersteller angegebenen Puffer bei 37 °C für 2 bis 3 h. Bei gleichzeitigem Verdau mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen wurde in Herstellertabellen ein Puffer ermittelt, in dem beide Enzyme schneiden. Gegebenenfalls wurden die Restriktionsendonukleasen bei 65 °C für 20 min hitzeinaktiviert.

### 3.8.12 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Nach Verdau der DNA mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen wurde die 5'-Phosphatenden geschnittener Vektor-DNA mit 3 U Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) dephosphoryliert. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die SAP durch 20minütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert.



### 3.8.13 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Für sämtliche Klonierungsarbeiten wurden DNA-Fragmente nach einem Restriktionsverdau aus 1%igen Agarose-Gelen mit Hilfe des Gelextraktions-Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben extrahiert. Für DNaseI Footprint Analysen oder *in vitro*-Transkriptionsexperimenten wurde nach Durchführung einer PCR die amplifizierte DNA mit Hilfe des PCR-Reinigungs-Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben gereinigt.

### 3.8.14 Ligation von DNA

Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10 µl. Dazu wurden 25 ng Vektor, 100 ng Insert, T4-DNA-Ligase (1 U), 1 µl 10fach Puffer und ein entsprechendes Volumen deionisiertes Wasser für 2 Stunden bei 25 °C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde die Ligase durch 20minütiges Erhitzen bei 65 °C inaktiviert.

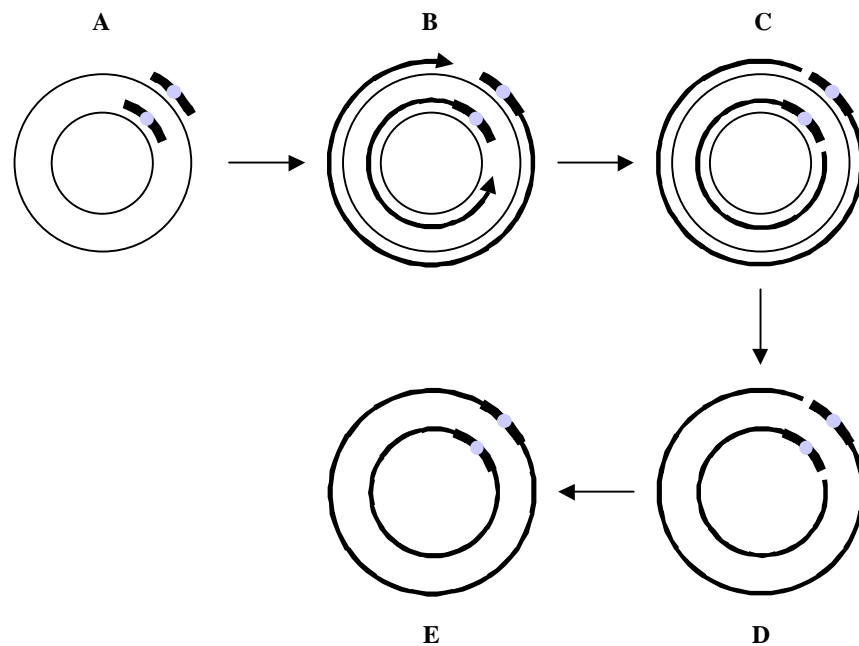
### 3.8.15 Annealing von Oligonukleotiden

Die Oligonukleotide werden in einer Konzentration von 100 nM/ml in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß zusammengegeben. Zu dem Ansatz werden 10fach Annealing Puffer und ein entsprechendes Volumen Milli Q-Wasser hinzugegeben. Das Gemisch wird für 10 min in einem Thermoblockschüttler bei 95 °C inkubiert. Bei Raumtemperatur werden die Oligonukleotide innerhalb einer Stunde abgekühlt.

| <b>Stocklösung</b>       |                                     | <b>Endkonzentration</b>              |
|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Oligonukleotid I         |                                     | 100 nM/ml                            |
| Oligonukleotid II        |                                     | 100 nM/ml                            |
| 10fach Annealing Puffer: | 100 mM Tris-HCl, pH 7,5<br>1 M NaCl | 1fach Annealing Puffer               |
| Milli Q-Wasser           |                                     | Auffüllen auf entsprechendes Volumen |

### 3.8.16 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese von DNA wurde mittels des `QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit´ der Firma Stratagene (La Jolla, USA) durchgeführt. Zur Mutagenese werden Primer eingesetzt, die an einer Position Mutationen tragen. Sense- und Antisense-Primer werden so synthetisiert, dass sie zueinander komplementär sind. Voraussetzung ist, dass das zu mutierende Gen in einen Vektor, hier in pGex-6P1, kloniert vorliegt. Im Verlauf der PCR binden die beiden Primer zunächst an jeweils die Bereiche der denaturierten, parentalen Sense- und Antisense-DNA, in welche die Mutation eingeführt werden sollen. Die *Pfu*-DNA-Polymerase verlängert in beide Richtungen. Es entstehen zirkuläre Stränge, die jeweils einen Bruch tragen. In folgenden PCR-Zyklen werden diese Stränge vermehrt. Da die parentale DNA durch Modifikationssysteme des Wirtsbakteriums methyliert vorliegt, kann sie von der amplifizierten, mutierten DNA unterschieden und folglich von der Restriktionsendonuklease *Dpn* I selektiv verdaut werden. *E. coli* DH10b Zellen, die die Strangbrüche reparieren werden im nächsten Arbeitsschritt mit den mutierten Plasmiden transformiert. Über eine Plasmid-Präparation wird die DNA amplifiziert und gereinigt (Abb. 12). Jede Mutation wurde durch eine DNA-Sequenzbestimmung überprüft.



**Abb. 12: Prinzip der ortsgerichteten Mutagenese.** Zunächst binden die Primer, die die gewünschte Mutation - hier als blauer Punkt dargestellt - tragen, an die denaturierte, parentale DNA (A). Sie werden anschließend durch die *Pfu*-DNA-Polymerase verlängert (B). Es entstehen DNA-Stränge, die einen Bruch aufweisen (C). Im folgendem wird die methylierte, parentale DNA durch *Dpn* I verdaut (D). Eine Transformation in *E. coli* bewirkt die Reparatur der Strangbrüche; das zirkuläre, mutierte Plasmid kann aus den Zellen extrahiert werden (E).

### 3.8.17 DNA-Gelelektrophorese

Zur Agarose-Gelelektrophorese wurden fünf Volumen DNA-Lösung mit einem Volumen Probenpuffer (6fach) vermischt, auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen und in TAE-Puffer gelegt. Anschließend wurde ein elektrisches Feld angelegt. In 1%igen Gelen (7,0 cm x 8,2 cm x 0,7 cm) lassen sich DNA-Fragmente von 0,5 kb bis 10 kb bei einer Einstellung der Stromquelle auf 75 V, 120 mA und mit einer Laufdauer von 60 min trennen. Nach Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid konnten DNA-haltige Gelbereiche durch Anregung mit Licht der Wellenlänge  $\lambda = 312 \text{ nm}$  visualisiert und über eine Geldokumentationsanlage (GelDoc) digitalisiert werden. Ein DNA-Längenstandard (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) diente zum Größenvergleich und ggf. zur Quantifizierung der DNA.

|            |         |                      |
|------------|---------|----------------------|
| TAE-Puffer | 40,0 mM | TRIS-Acetat (pH 8,0) |
|            | 1,0 mM  | EDTA                 |

|                      |                 |                          |
|----------------------|-----------------|--------------------------|
| Agarosegel:          | 1,0 % (w/v)     | Agarose in TAE-Puffer    |
| Ethidiumbromidlösung | 0,1 % (w/v)     | Ethidiumbromid in Wasser |
| Probenpuffer (6x)    | Bromphenolblau  | 350,0 µM                 |
|                      | Xylen Cyanol FF | 450,0 µM                 |
|                      | Orange G        | 0,25 % (w/v)             |
|                      | Saccharose      | 115,0 µM                 |

### 3.8.18 DNA-Sequenzbestimmung

Die nichtradioaktive Sequenzierung doppelsträngiger DNA basiert auf dem Prinzip des Kettenabbruchsverfahrens nach (Sanger *et al.*, 1977). Vergleichbar mit einer PCR wird in einer enzymatischen Reaktion der komplementäre Strang zum Matrizen-Strang gebildet. Im Reaktionsansatz wird nur ein Primer eingesetzt, so dass es zu einer linearen Vermehrung kommt. Zusätzlich zu Desoxynukleotiden (dNTPs) werden Didesoxynukleotide (ddNTPs) in geringen Mengen zum Ansatz gegeben, welche die Bildung einer Phosphodiesterbindung mit einem weiteren Nukleotid verhindern, da ihnen die dazu notwendige 3'-Hydroxyl-Gruppe fehlt. Es kommt zum Kettenabbruch. Da die ddNTPs zufällig eingebaut werden, entstehen Fragmente unterschiedlicher Größe.

Die Auftrennung dieser Fragmente erfolgte durch Kapillarelektrophorese in einem automatisierten Sequenziergerät. Zur Analyse sind die vier verwendeten ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, so dass die Fragmente in Abhängigkeit des jeweiligen Nukleotids einen dieser Farbstoffe tragen. Bei Anregung mit einem Laserstrahl weisen sie entsprechend unterschiedliche Emissionsspektren auf und können mit dem Sequenziergerät detektiert werden. Die Auswertung der Sequenzierreaktion erfolgt automatisch über die gerätespezifische Software.

Die Sequenzierreaktion wurde wie folgt angesetzt:

|  |               |
|--|---------------|
| „ABI-Premix“ (Perkin Elmer Applied Biosystems)               | 2 µl          |
| Primer (10 pmol/µl)  | 1 µl          |
| Puffer TSR   | 2 µl          |
| dsDNA  | 1-5 µl (1 µg) |
| Der Ansatz wird auf 10 µl mit ddH <sub>2</sub> O aufgefüllt. |               |

Die Reaktionsbedingungen der Sequenzier-PCR:

|       |       |  |           |
|-------|-------|--|-----------|
| 96 °C | 1 min | Initiale Denaturierung                 |           |
| 96 °C | 1 min | Denaturierung der amplifizierten dsDNA | 25 Zyklen |
| 50 °C | 1 min | Annealing der Primer                   |           |
| 60 °C | 4 min | Polymerisation                         |           |
| 10 °C | Pause | Kühlung                                |           |

Nach der PCR-Reaktion wurden die Proben für die Analyse weiter aufgereingt. Zur Fällung der DNA nach der Sequenzierreaktion wurden die folgenden Lösungen zugegeben.

|                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
| deion. H <sub>2</sub> O           | 90 µl  |
| 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5.2) | 10 µl  |
| Reines Ethanol (100 %)            | 250 µl |

Die DNA wurde 20 min bei Raumtemperatur gefällt, anschließend 15 min bei 10,000 x g sedimentiert und der Überstand mit überschüssigen Primern, dNTPs und fluoreszenzmarkierten ddNTPs verworfen. Das Präzipitat wurde zweimal mit 300 µl reinem Ethanol (70%ig) gewaschen. Nach der Trocknung für 10 min bei 50 °C wurde es in 12,5 µl "Template Suppression Reagents" (Perkin Elmer Applied Biosystems) aufgenommen und in ein Sequenziergefäß überführt. Die Auswertung der Reaktion erfolgte mit dem Sequenziergerät (Genetic Analyzer

ABI Prism™ 310, Applied Biosystems) und der Software DNA Star (GATC). Biotech, Konstanz).

### 3.8.19 Konstruktion von Plasmiden zur Komplementation einer *Bacillus subtilis* *fnr*-Mutante

Der Komplementationsvektor pHRB1*fnr* (Reents, 2005) lag bereits vor. Um Mutationen in das *fnr*-Gen einzubringen, wurde eine ortsgerichtete Mutagenese mit pGEX*fnr* als Matrize durchgeführt. Dies erfolgte mit dem QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach Herstellerangaben. Nach erfolgreicher Mutation wurde das *fnr*-Insert mit *Bam*HI und *Not*I geschnitten und mit ebenso geschnittenem pHRB1 religiert. Die jeweiligen Mutationen, die durch ortsgerichtete Mutagenese mit den entsprechenden Primern erhalten wurden, sind in Tabelle 5 zu entnehmen.

**Tabelle 5** Primer zur Konstruktion verschiedener *fnr*-Mutanten

| Vektor                 | Primerpaar            |
|------------------------|-----------------------|
| pHRB1 <i>fnr</i> D63A  | IG21/IG22             |
| pHRB1 <i>fnr</i> D76A  | IG23/IG24             |
| pHRB1 <i>fnr</i> D99A  | IG25/IG26             |
| pHRB1 <i>fnr</i> D141A | IG27/IG28             |
| pHRB1 <i>fnr</i> D141C | IGD141C/IGD141C       |
| pHRB1 <i>fnr</i> S153A | EH196/EH197           |
| pHRB1 <i>fnr</i> L155A | EH200/EH201           |
| pHRB1 <i>fnr</i> R157A | EH204/EH205           |
| pHRB1 <i>fnr</i> G64A  | EH265/EH266           |
| pHRB1 <i>fnr</i> R189V | IG59-R189V/IG60-R189V |
| pHRB1 <i>fnr</i> E190A | IG61-E190A/IG62-E190A |

### 3.8.20 Konstruktion von Plasmiden zur rekombinanten Darstellung von Fnr aus *Bacillus subtilis*

Zur biochemischen Charakterisierung wurden die mutierten Gene *fnr*D63A, *fnr*D76A, *fnr*D99A, *fnr*D141A, *fnr*D141C, *fnr*S153A, *fnr*L155A, *fnr*R157A,

*fnr*G64A, *fnr*R189V und *fnr*E190A jeweils in den Expressionsvektor pASK-IBA45plus (IBA, Göttingen, Deutschland) kloniert. Hierzu wurden die mutierten *fnr*-Gene aus den entsprechenden Vektoren pHRB1*fnr*xxx mit den Primern HR52 und HR39 amplifiziert und über die Schnittstellen EcoRI und XhoI mit pASK-IBA45plus zu pHRB2*fnr*D63A, pHRB2*fnr*D76A, pHRB2*fnr*D99A, pHRB2*fnr*D141A, pHRB2*fnr*D141C, pHRB2*fnr*DS153A, pHRB2*fnr*DL155A, pHRB2*fnr*R157A, pHRB2*fnr*G64A, pHRB2*fnr*R189V und pHRB2*fnr*E190A fusioniert.

Zur Proteinproduktion für die Kristallisation des FnrCCC wurde das *fnr*CCC-Gen in verschiedene Expressionsvektoren kloniert. Für die Klonierung in den Vektor pASK-IBA13plus (IBA, Göttingen, Deutschland) wurde das *fnr*CCC aus dem Vektor pHRB1*fnr*CCC mit den Primern HR39/EH185 amplifiziert und über die Schnittstellen SacII und XhoI mit dem Vektor pASK-IBA13plus zu pASK-IBA-13plus*fnr*CCC fusioniert.

Um das *fnr*CCC-Gen in den Vektor pASK-IBA43plus (IBA, Göttingen, Deutschland) zu klonieren, wurde das *fnr*CCC aus dem Vektor pHRB1*fnr*CCC mit den Primern HR39/IG31 amplifiziert und über die Schnittstellen SacII und XhoI mit dem Vektor pASK-IBA43plus zu pASK-IBA-43plus*fnr*CCC fusioniert.

Für die Klonierung von *fnr*CCC in den Vektor pET5a (Novagen, Darmstadt, Deutschland) wurde das *fnr*CCC aus dem Vektor pHRB1*fnr*CCC mit den Primern IG34/IG35 amplifiziert und über die Schnittstellen BamHI und NdeI mit dem Vektor pET5a zu pET5a*fnr*CCC fusioniert.

Um das *fnr*CCC in den Vektor pET32a (Novagen, Darmstadt, Deutschland) zu klonieren, wurde das *fnr*CCC aus dem Vektor pHRB1*fnr*CCC mit den Primern HR39/IG32 amplifiziert und über die Schnittstellen NcoI und XhoI mit dem Vektor pET32a zu pET32a*fnr*CCC fusioniert.

Zur Klonierung von *fnr*CCC in den Vektor pET52b (Novagen, Darmstadt, Deutschland) wurde das *fnr*CCC aus dem Vektor pHRB1*fnr*CCC mit den Primern IG34/IG38 amplifiziert und über die Schnittstellen BamHI und XmaI mit dem Vektor pET52b zu pET52b*fnr*CCC fusioniert.

Zur Proteinproduktion wurden die Plasmide jeweils in den *E. coli* Stamm BL21CD+(DE3)-RIL (Stratagene, La Jolla, USA) eingebracht.

### 3.8.21 Konstruktion von Plasmiden zur rekombinaten Darstellung von FnrCCCC aus *Geobacillus stearothermophilus*

Zur Proteinproduktion für die Kristallisation des FnrCCCC aus *G. stearothermophilus* wurde das Gen *fnrCCCC* in verschiedene Expressionsvektoren kloniert.

Um *fnrCCCC* in den Vektor pASK-IBA43plus (IBA, Göttingen, Deutschland) kloniert zu klonieren wurde das *fnrCCCC* aus dem Vektor pSLB9 mit den Primern IG29/IG30 amplifiziert und über die Schnittstellen SacII und XhoI mit dem Vektor pASK-IBA43plus zu pASK-IBA-43plus*fnrCCC* fusioniert.

Für die Klonierung von *fnrCCCC* in den Vektor pET5a (Novagen, Darmstadt, Deutschland) wurde das *fnrCCCC* aus dem Vektor pSLB9 mit den Primern IG36/IG37 amplifiziert und über die Schnittstellen BamHI und NdeI mit dem Vektor pET5a zu pET-5a*fnrCCCC<sub>stearo</sub>* fusioniert.

Um *fnrCCCC* in den Vektor pET32a (Novagen, Darmstadt, Deutschland) zu bringen, wurde das *fnrCCCC* aus dem Vektor pSLB9 mit den Primern IG33/IG29 amplifiziert und über die Schnittstellen NcoI und XhoI mit dem Vektor pET32a zu pET-32a*fnrCCCC<sub>stearo</sub>* fusioniert.

Zur Klonierung von *fnrCCCC* in den Vektor pET52b (Novagen, Darmstadt, Deutschland) wurde das *fnrCCCC* aus dem Vektor pSLB9 mit den Primern IG36/IG39 amplifiziert und über die Schnittstellen BamHI und XmaI mit dem Vektor pET52b zu pET-52b*fnrCCCC<sub>stearo</sub>* fusioniert.

Zur Proteinproduktion wurden die Plasmide jeweils in den *E. coli* Stamm BL21CD+(DE3)-RIL (Stratagene, La Jolla, USA) gebracht.

### 3.8.22 Konstruktion von Plasmiden zur rekombinaten Darstellung von ResD und ResE aus *Bacillus subtilis*

Zur Proteinproduktion des ResD und ResE\* wurden die Gene *resD* und *resE\** in den Expressionsvektor pET52b (Novagen, Darmstadt, Deutschland) kloniert. Hierzu wurde das *resD*-Gen aus genomischer DNA aus *B. subtilis* mit den Primern EH267/EH268 amplifiziert und über die Schnittstellen SacI und XmaI mit dem Vektor pET52b zu pET-52b*resD* fusioniert. Zur Klonierung von *resE\** wurde ein 1142 bp *resE*-Fragment aus genomischer DNA aus *B. subtilis* mit den Primern EH269/EH270 amplifiziert und über die Schnittstellen SacI und



XmaI mit dem Vektor pET52b zu pET-52b*resE*\* fusioniert. Zur Proteinproduktion wurde der *E. coli* Stamm BL21CD+(DE3)-RIL (Stratagene, La Jolla, USA) mit diesen Vektoren transformiert.

### 3.8.23 Konstruktion von Plasmiden für die ChAP Analyse

Zur Proteinproduktion des Strep-Fnr und Rex-Strep für die ChAP Analyse wurden die Gene *fnr* und *rex* in den Vektor pBQ200 kloniert. Für die Klonierung des *fnr*-Gens wurde dieses mit N-terminalen Strep-Tag aus dem Vektor pHRB2*fnr* mit den Primern IG41/IG42 amplifiziert und über die Schnittstellen BamHI und PstI mit dem Vektor pBQ200 zu pBQ*strepfnr* fusioniert. Um das *rex*-Gen in den pBQ200 zu klonieren, wurde es aus genomischer DNA aus *B. subtilis* mit den Primern EH213/EH214 amplifiziert, wobei über den Primer EH214 ein C-terminaler Strep-Tag an das Zielprotein fusioniert wird. Über die Schnittstellen BamHI und PstI wird *rexstrep* mit dem Vektor pBQ200 zu pBQ*strepfnr* fusioniert.

### 3.8.24 Konstruktion von Plasmiden für die *in vivo* Bindungsstudien

Das Plasmid p-53(wt)*narK-lacZ* wurde durch Anealling der Oligonukleotide EH273/EH274 hergestellt, welche über die Schnittstellen BamHI und EcoRI in den Vektor pDIA5322 eingebracht wurden.

p-53(-12)*narK-lacZ* wurde durch Anealling der Oligonukleotide EH275/EH276, die in den Vektor pDIA5322 über die Schnittstellen BamHI und EcoRI eingebracht wurden, hergestellt.

p-75(wt)*ywcJ-lacZ* wurde durch Amplifikation eines *ywcJ*-Promotorfragments aus dem Plasmid p-75*ywcJ-lacZ* mit den Primern EH299/EH230, das über die Schnittstellen BamHI und EcoRI in den Vektor pDIA5322 eingebracht wurde, erhalten.

p-90(wt)*ywcJ-lacZ* wurde durch die Amplifikation eines *ywcJ*-Promotorfragments aus dem Plasmid p-90*ywcJ-lacZ* mit den Primern EH299/EH296, das über die Schnittstellen BamHI und EcoRI in den Vektor pDIA5322 eingebracht wurde, hergestellt.

Die Plasmide p-75(+12)*ywcJ-lacZ* und p-90(+12)*ywcJ-lacZ* wurden durch Annealing der Oligonukleotide EH279/EH280 erhalten. Diese wurden über die Schnittstellen BamHI und EcoRI mit dem Vektor pDIA5322 fusioniert, welches dann als Template für die Herstellung der Konstrukte diente. Durch Amplifikation mit den Primern EH299/EH295 wurde das Fragment über die Schnittstellen BamHI und EcoRI mit dem Vektor pDIA5322 zu p-75(+12)*ywcJ-lacZ* fusioniert. Außerdem wurde durch Amplifikation mit den Primern EH299/EH296 ein Fragment über die Schnittstellen BamHI und EcoRI in den Vektor pDIA5322 eingebracht, was ergab p-90(+12)*ywcJ-lacZ*.

### **3.8.25 Herstellung von *Bacillus subtilis* Stämmen zum Test von Reportergenfusionen**

Der *B. subtilis* Stämme HRB3 (Reents, 2005) lag bereits vor. Zur Herstellung des Stamms HRB3*fnr* wurde der Stamm HRB3 mit dem Vektor pHRB1*fnr* transformiert. Zur Komplementation mit mutiertem *fnr* wurden die entsprechenden Vektoren zur Transformation eingesetzt. Zur Herstellung des Stamms HRB3*fnr*D63A wurde HRB3 mit dem Vektor pHRB1*fnr*D63A transformiert. Zur Herstellung des Stamms HRB3*fnr*D76A wurde HRB3 mit dem Vektor pHRB1*fnr*D76A transformiert. Zur Herstellung des Stamms HRB3*fnr*D99A wurde HRB3 mit dem Vektor pHRB1*fnr*D99A transformiert. Zur Herstellung des Stamms HRB3*fnr*D141A wurde HRB3 mit dem Vektor pHRB1*fnr*D141A transformiert. Zur Herstellung des Stamms HRB3*fnr*D141C wurde HRB3 mit dem Vektor pHRB1*fnr*D141C transformiert. Zur Herstellung des Stamms HRB3*fnr*S153A wurde HRB3 mit dem Vektor pHRB1*fnr*S153A transformiert. Zur Herstellung des Stamms HRB3*fnr*L155A wurde HRB3 mit dem Vektor pHRB1*fnr*L155A transformiert. Zur Herstellung des Stamms HRB3*fnr*R157A wurde HRB3 mit dem Vektor pHRB1*fnr*R157A transformiert. Zur Herstellung des Stamms HRB3*fnr*G64A wurde HRB3 mit dem Vektor pHRB1*fnr*G64A transformiert. Zur Herstellung des Stamms HRB3*fnr*R189V wurde HRB3 mit dem Vektor pHRB1*fnr*R189V transformiert. Zur Herstellung des Stamms HRB3*fnr*E190A wurde HRB3 mit dem Vektor pHRB1*fnr*E190A transformiert.

Die erhaltenen Einzelkolonien wurden auf einen Ampicilin und Amylase negativen Phänotyp überprüft. Die Aktivität von Fnr wurde durch blau-weiß-Selektion überprüft.

### **3.8.26 Herstellung von *Bacillus subtilis* Stämmen für die ChAP Analysen**

Die *B. subtilis* Stämme HRB3 (Reents, 2005) und IGB25 (Anja Hartmann, 2005) lagen bereits vor. Zur Herstellung des Stamms IGB24 wurde der Stamm HRB3 mit dem Vektor pBQstrepfnr transformiert. Zur Herstellung des Stamms IGB26 wurde der Stamm IGB25 mit dem Vektor pBQrexstrepr transformiert.

Die erhaltenen Einzelkolonien wurden mit entsprechenden Antibiotika selektioniert.

### **3.8.27 Herstellung von *Bacillus subtilis* Stämmen zur Untersuchung modifizierter *narK*- und *ywcJ*-Promotorfragmente**

Die *B. subtilis* Stämme JH642 (BGSC, 1A96), THB2 (Hoffmann *et al.*, 1995), IGB13 (Anja Hartmann 2005) und MH5081 (Sun *et al.*, 1996b) lagen bereits vor. Zur Herstellung des Stamms IGB1 wurde der Stamm JH642 mit dem Vektor p-53(wt)*narK-lacZ* transformiert. Zur Herstellung des Stamms IGB2 wurde der Stamm JH642 mit dem Vektor p-53(-12)*narK-lacZ* transformiert. Zur Herstellung des Stamms IGB3 wurde der Stamm JH642 mit dem Vektor p-75(wt)*ywcJ-lacZ* transformiert. Zur Herstellung des Stamms IGB4 wurde der Stamm JH642 mit dem Vektor p-75(+12)*ywcJ-lacZ* transformiert. Zur Herstellung des Stamms IGB5 wurde der Stamm JH642 mit dem Vektor p-90(wt)*ywcJ-lacZ* transformiert. Zur Herstellung des Stamms IGB6 wurde der Stamm JH642 mit dem Vektor p-90(+12)*ywcJ-lacZ* transformiert. Zur Herstellung des Stamms IGB7 wurde der Stamm THB2 mit dem Vektor p-53(wt)*narK-lacZ* transformiert. Zur Herstellung des Stamms IGB8 wurde der Stamm THB2 mit dem Vektor p-53(-12)*narK-lacZ* transformiert. Zur Herstellung des Stamms IGB9 wurde der Stamm THB2 mit dem Vektor p-75(wt)*ywcJ-lacZ* transformiert. Zur Herstellung des Stamms IGB10 wurde der Stamm THB2 mit dem Vektor p-75(+12)*ywcJ-lacZ* transformiert. Zur Herstellung des Stamms IGB11 wurde der Stamm THB2 mit dem Vektor p-90(wt)*ywcJ-lacZ* transformiert. Zur Herstellung des Stamms IGB12 wurde der Stamm THB2 mit dem Vektor p-90(+12)*ywcJ-lacZ*

transformiert. Zur Herstellung des Stamms IGB14 wurde der Stamm IGB13 mit dem Vektor *p-53(wt)nark-lacZ* transformiert. Zur Herstellung des Stamms IGB15 wurde der Stamm IGB13 mit dem Vektor *p-53(-12)nark-lacZ* transformiert. Zur Herstellung des Stamms IGB16 wurde der Stamm IGB13 mit dem Vektor *p-75(wt)ywcJ-lacZ* transformiert. Zur Herstellung des Stamms IGB17 wurde der Stamm IGB13 mit dem Vektor *p-75(+12)ywcJ-lacZ* transformiert. Zur Herstellung des Stamms IGB18 wurde der Stamm IGB13 mit dem Vektor *p-90(wt)ywcJ-lacZ* transformiert. Zur Herstellung des Stamms IGB19 wurde der Stamm IGB13 mit dem Vektor *p-90(+12)ywcJ-lacZ* transformiert.

Zur Herstellung des Stamms IGB20 wurde der Stamm MH5081 mit dem Vektor *p-75(wt)ywcJ-lacZ* transformiert. Zur Herstellung des Stamms IGB21 wurde der Stamm MH5081 mit dem Vektor *p-75(+12)ywcJ-lacZ* transformiert. Zur Herstellung des Stamms IGB22 wurde der Stamm MH5081 mit dem Vektor *p-90(wt)ywcJ-lacZ* transformiert. Zur Herstellung des Stamms IGB23 wurde der Stamm MH5081 mit dem Vektor *p-90(+12)ywcJ-lacZ* transformiert.

### **3.9 Biochemische Techniken**

#### **3.9.1 Anaerobisieren von Lösungen**

Bei Lösungen und Puffern, die für anaerobe Arbeiten eingesetzt wurden, wurde ein Gasaustausch gegen Stickstoff vorgenommen. Dazu wurden 500 ml Puffer oder Lösungen 6 Stunden jeweils 2 minütigen Wechseln Vakuum und Stickstoffbegasung (1 bar) ausgesetzt.

#### **3.9.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Sodiumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz, das die Eigenladungen von Proteinen maskiert. Es entstehen Micellen mit einer konstanten negativen Ladung pro Masseneinheit (ca. 1,4 g SDS pro Gramm Protein). Für die Elektrophorese wurden 10 µl Proteinlösung mit 10 µl SDS versetzt und anschließend 5 min bei 95 °C denaturiert. Disulfidbrücken zwischen Cysteinen wurden durch Zugabe von β-Mercaptoethanol reduziert.

Diese mit SDS beladenen, gestreckten Aminosäureketten bilden Ellipsoide. Über die Bestimmung der Wanderungstrecken der SDS-Polypeptid-Ketten und Vergleich mit einem Proteinstandard bekannter Größe können die Molekulargewichte der Proteine ermittelt werden, da die Proteine ausschließlich nach Größe getrennt werden.

In dieser Arbeit wurden 6%ige Sammelgele und 13,2%ige Trenngele eingesetzt. Die Gele wurden mit Hilfe des Mini Protean 3 Systems (BioRad, München, Deutschland) gegossen. Anschließend wurde Proteinlösung zusammen mit dem Prestained Marker (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) auf das Gel aufgetragen und 40 min bei 45 mA getrennt. Durch eine Färbung mit Coomassie Blue wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel zunächst für 30 Minuten mit Färbelösung behandelt. Danach folgte eine 15stündige Entfärbung und Trocknung der Gele. Anschließend wurden die Gele digitalisiert.

|                                    |            |                         |
|------------------------------------|------------|-------------------------|
| Sammelgelpuffer:                   | 0,4% (w/v) | SDS                     |
|                                    | 1,5 M      | TrisHCl (pH 6,8)        |
| Trenngelpuffer                     | 0,4% (w/v) | SDS                     |
|                                    | 1,5 M      | TrisHCl (pH 8,8)        |
| Sammelgel<br>(6%ig, für 4 Gele):   | 2,0 ml     | NF-Acrylamid/Bis (29:1) |
|                                    | 2,5 ml     | Sammelgelpuffer         |
|                                    | 5,5 ml     | Wasser                  |
|                                    | 10,0 µl    | TEMED                   |
|                                    | 100,0 µl   | APS-Lösung (10 %)       |
| Trenngel<br>(13,2%ig, für 4 Gele): | 8,8 ml     | NF-Acrylamid/Bis (29:1) |
|                                    | 5,0 ml     | Trenngelpuffer          |
|                                    | 6,2 ml     | Wasser                  |
|                                    | 20,0 µl    | TEMED                   |
|                                    | 200,0 µl   | APS-Lösung              |

|                       |             |                                |
|-----------------------|-------------|--------------------------------|
| Elektrophoresepuffer: | 385,0 mM    | Glycin                         |
|                       | 0,1% (w/v)  | SDS                            |
|                       | 50,0 mM     | TrisHCl (pH 8,8)               |
| Probenpuffer:         | 40,0% (w/v) | Glycerin                       |
|                       | 2,0 mM      | $\beta$ -Mercaptoethanol       |
|                       | 110,0 mM    | SDS                            |
|                       | 3,0 mM      | Bromphenolblau                 |
|                       | 100,0 mM    | TrisHCl (pH 6,8)               |
| Färbelösung:          | 10,0% (v/v) | Essigsäure                     |
|                       | 1,0 g/l     | Coomassie Brilliant Blue G-250 |
| Entfärbelösung:       | 30,0%(v/v)  | Ethanol                        |
|                       | 10,0% (v/v) | Eisessig                       |

### 3.9.3 Westernblot

Das Western Blotting ist ein sehr empfindliches und spezifisches Verfahren zum Proteinnachweis. Es verbindet die hohe Trennschärfe der Gelelektrophorese mit der Spezifität der Antikörpererkennung und der Empfindlichkeit von Enzymreaktionen. In diesem Dreischrittverfahren wurden Proteine zunächst getrennt und anschließend das gesuchte Protein sichtbar gemacht. Nach der Trennung durch die SDS-Gelelektrophorese wurde das Gel zusammen mit der an das Gel angepassten Trägermembran und zwei Whatman-Paper (WP) in eine Schale mit Towbin-Puffer überführt. WP, Trägermembran und Gel wurden übereinander auf den Elektroblotter gelegt und 15 min bei 15 V geblottet. Die Membran wurde über Nacht in Blocking-Puffer bei 4 °C inkubiert. Es folgte ein mehrmaliges Waschen mit PBS-Tween Puffer. Daraufhin wurde die Membran 10 min mit 2  $\mu$ /ml Avidin inkubiert, um unspezifische Bindungen zu sättigen. Es wurden 2,5  $\mu$ l des Antikörpers Streptavidin Alkaline Phosphatase zu einem Volumen von 10 ml hinzugegeben und 60 min inkubiert. Dieser Antikörper weist eine hohe Bindungsaffinität zu dem Strep-Tag auf, so dass nur das gesuchte Strep-Fnr Fusionsprotein erkannt wird. Der genutzte Antikörper ist kovalent mit

einer alkalischen Phosphatase gekoppelt. Es wurde mehrmals mit PBS-Tween-Puffer und PBS-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Durch das Zugabe des Reaktionspuffers fand eine chromogene Farbreaktion statt und die Bindung des Antikörpers wurde durch einen violetten Niederschlag sichtbar.

|  |  |  |
|--|--|--|
| Towbin Puffer                                | 25 mM<br>150 mM<br>10 % (v/v)          | Tris pH 8,5<br>Glycin<br>Methanol  |
| 10 x PBS-Puffer                              | 1,37 M<br>27 mM<br>100 mM<br>20 mM     | NaCl<br>KCl<br>Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |
| Blocking-Puffer                              | 10 % (v/v)<br>5 % (w/v)<br>0,1 % (v/v) | 10 x PBS<br>BSA<br>Tween20   |
| PBS-Tween-Puffer                             | 10 % (v/v)<br>0,1 % (v/v)              | 10 x PBS<br>Tween20  |
| 1 x PBS-Puffer:                              | 10 % (v/v)                             | 10 x PBS   |
| Biotin-Blocking-Puffer:                      | 2 µg/ml                                | Avidin (2 mg/ml)   |
| Strep-Tactin Antikörper:<br>(IBA, Göttingen) | 1:4000                                 | 2,5 µl   |
| APB-Puffer:                                  | 100 mM<br>100 mM<br>5 mM               | Tris-HCl pH 9,5<br>NaCl<br>MgCl <sub>2</sub>                                       |

|                  |       |                                      |
|------------------|-------|--------------------------------------|
| Reaktionspuffer: | 10 ml | APB-Puffer                           |
|                  | 66 µl | NBT-Lösung (50 mg/ml<br>in 70 % DMF) |
|                  | 33 µl | BCIP-Lösung (50 mg/ml<br>in DMF)     |

### 3.9.4 Proteinproduktionstest und Probenaufbereitung für die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die Proteinproduktion durch verschiedene Expressionsvektoren zu testen, wurden *E. coli* BL21C+-Zellen mit dem jeweiligen Vektore transformiert. 5 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie beimpft und für 16 Stunden bei 37 °C und 180 upm inkubiert. Mit 1 ml dieser Kultur wurden 100 ml LB-Medium in einem 300 ml Erlenmeyerkolben beimpft. Bei Erreichen einer  $OD_{578nm} = 0,5-1$  wurde die Proteinproduktion durch Zugabe des entsprechenden Induktors induziert. Die Zellen wurden unter verschiedenen Bedingungen inkubiert. Stündlich wurde eine Probe einer  $OD_{578nm}$  von 2 entnommen und pelletiert. Das Zellsediment wurde in 40 µl Lysepuffer resuspendiert und für 30 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Darauf folgte eine Trennung durch Zentrifugation (90 min, 13000 upm, 4 °C). Der Überstand wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und 15 µl SDS-Probenpuffer hinzugegeben. Die Proben wurden 5 min bei 95 °C inkubiert. Dieses entsprach der löslichen Fraktion.

Das zuvor erhaltene Sediment wurde in 40 µl Milli Q-Wasser resuspendiert und mit 15 µl SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden für 15 min bei 95 °C inkubiert und anschließend für 20 min (13000 upm, RT) zentrifugiert. Dieses entsprach der unlöslichen Fraktion.

Die so erhaltenen Proben wurden zur Analyse auf eine SDS-PAGE aufgetragen.

|             |   |
|-------------|---|
| Lysepuffer: | 8,75 mg/ml Lysozym in 800 µl Z-<br>Puffer Basis                 |
|             | 25 mg/ml DNase in 200 µl Milli Q +<br>20 µl 3 M NaAcetat pH 4,8 |



|                 |   |
|-----------------|---|
| Z-Puffer Basis: | 60 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O |
|                 | 40 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O   |
|                 | 10 mM KCl   |
|                 | 1 mM MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O                 |
| Probenpuffer    | 40,0% (w/v)   |
|                 | 2,0 mM  |
|                 | 110,0 mM  |
|                 | 3,0 mM  |
|                 | 100,0 mM  |

### 3.9.5 Denaturierende Polyacrylamidgele zur Trennung von RNA-Fragmenten für *in vitro* Transkriptions Analysen

Für 100 ml Gel wurden 20 ml Acrylamidlösung (NF-Acrylamid/Bis (29:1)), 10 ml 10fach TBE-Lösung und 42 g Harnstoff gemischt, auf ein Endvolumen von 100 ml aufgefüllt und unter Wärmezufuhr gelöst. Die Polymerisation wurde mit 800 µl 10%igem APS und 40 µl TEMED gestartet. Die Trennung der RNA-Fragmente erfolgte bei 30 mA. Als Laufpuffer wurde 1fach TBE eingesetzt.

|                   |         |                  |
|-------------------|---------|------------------|
| 10fachTBE-Puffer: | 90,0 mM | TrisHCl (pH 8,3) |
|                   | 90,0 mM | Borsäure         |
|                   | 2,5 mM  | EDTA (pH 8,0)    |

### 3.9.6 Heterologe Produktion- und Reinigung von *Bacillus subtilis* Fnr über einen Strep-Affinitätstag

Das *B. subtilis* Fnr wurde als Fusion mit einem Strep-Affinitätstag gereinigt. In dem Vektor pASK-IBA45plus ist die Expression unter der Kontrolle eines *tet*-Promotors. Die Produktion erfolgte in dem *E. coli* Stamm BL21CD+(DE3)-RIL (Stratgene, LA Jolla, USA). Es wurden 500 ml LB-Medium, mit entsprechenden Antibiotika, 10 mM Eisen-III-Citrat und 100 mM Natriumnitrat versetzt. Dieses Medium wurde mit 5 ml einer Übernachtskultur inokuliert und bei 37 °C schüttelnd (180 upm) inkubiert. Bei Erreichen der Zelldichte OD<sub>578nm</sub> von 0,6 wurde die Proteinproduktion durch Zugabe von 100 µl Anhydrotetracyclin-

Lösung (Konzentrat: 3 mg/ml) induziert und bei 25 °C für 16 Stunden inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt hatte die Kultur bereits eine optische Dichte von 3 bis 4 erreicht. Zur Rekonstitution des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums wurde die Bakteriensuspension unter anaeroben Bedingungen in einem Anaerobenzelt in Zentrifugenbecher mit O-Ring überführt und dort weitere 2 Stunden bei 17 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Bakteriensuspension zentrifugiert (10 min, 5000 g).

Alle folgenden Schritte wurden unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Das Zellsediment wurde in 25 ml Puffer W resuspendiert und der Zellaufschluss mit Hilfe einer French Press (1500 p.s.i.) durchgeführt und die aufgeschlossenen Zellen in eine mit Stickstoff-gefüllte und mit einem Septum verschlossene Transfusionsflasche aufgenommen. Um Zelltrümmer und unlösliches Protein abzutrennen, wurde der Zellextrakt bei 30000 upm zentrifugiert (Ja25.50, Beckman-Coulter, 4 °C, 1 h). Der Überstand wurde auf eine Strep-Tactin Säule mit 5 ml Säulenvolumen (IBA, Göttingen, Deutschland) aufgetragen, die zuvor mit 4 Säulenvolumen Puffer W äquilibriert worden war. Nach einem Reinigungsschritt von 10 Säulenvolumen (50 ml) mit Puffer W wurde das Protein mit zwei Säulenvolumen Puffer A (10 ml) von der Säule eluiert. Das Fusionsprotein wurde mittels SDS-Gelelektrophorese auf seine Reinheit geprüft.

|           |        |                   |
|-----------|--------|-------------------|
| Puffer W: | 100 mM | Tris-HCl (pH 7,5) |
|           | 150 mM | NaCl              |
|           | 5 mM   | DTT               |
| Puffer A: | 100 mM | Tris-HCl (pH 7,5) |
|           | 150 mM | NaCl              |
|           | 2,5 mM | Desthiobiotin     |
|           | 5 mM   | DTT               |

### 3.9.7 Heterologe Proteinproduktion und Reinigung von *Geobacillus stearothermophilus* FnrCCCC

Das *G. stearothermophilus* FnrCCCC wurde als Fusion mit einem Strep-Affinitätstag gereinigt. In dem Vektor pET-52b (Novagen, Deutschland) ist die Expression unter der Kontrolle eines T7-Promotors. Die Produktion erfolgte in dem *E. coli* Stamm BL21CD+(DE3)-RIL (Stratgene, LA Jolla, USA). Es wurden 500 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika, 10 mM Eisen-(III)-Citrat und 100 mM Natriumnitrat versetzt. Dieses Medium wurde mit 5 ml einer Übernachtskultur inokuliert und bei 37 °C schüttelnd (180 upm) inkubiert. Bei Erreichen der Zelldichte OD<sub>578</sub> von 0,6 wurde die Proteinproduktion durch Zugabe von 300 nM IPTG-Lösung induziert und bei 25 °C inkubiert. Zur Rekonstitution des [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrums wurde die Zellsuspension nach 2 Stunden Inkubation in 1 l Anaerobenflaschen mit Septum überführt. Dem Medium wurden 1 mM L-Cystein-Hydrochlorid zugefügt. Es folgte eine weitere Inkubation für 14 Stunden bei 25 °C. Die Bakteriensuspension wurde in einem Anaerobenzelt in Zentrifugenbecher mit O-Ring überführt und zentrifugiert (10 min, 5000g, Beckmann Coulter).

Alle folgenden Schritte wurden unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Das Zellsediment wurde in 25 ml Puffer W resuspendiert. Der Zellaufschluss wurde mit Hilfe einer French Press (1500 p.s.i.) durchgeführt und die aufgeschlossenen Zellen in eine mit Stickstoff-gefüllte und mit einem Septum verschlossene Transfusionsflasche aufgenommen. Um Zelltrümmer und unlösliches Protein abzutrennen, wurde der Zellextrakt 30000 upm zentrifugiert (Ja25.50, Beckman-Coulter, 4 °C, 1 h). Der Überstand wurde auf eine Strep-Tactin Säule mit 5 ml Säulenvolumen (IBA, Göttingen, Deutschland) aufgetragen, die zuvor mit 4 Säulenvolumen Puffer W äquilibriert worden war. Nach einem Reinigungsschritt von 10 Säulenvolumen (50 ml) mit Puffer W wurde das Protein mit zwei Säulenvolumen Puffer A (10 ml) von der Säule eluiert. Das Fusionsprotein wurde mittels SDS-Gelelektrophorese auf seine Reinheit geprüft.

Für die Kristallisation des FnrCCCC wurde der Strep-Tag des gereinigten Proteins mit 10 Units HRV 3C Protease (Novagen) pro mg Protein bei 25 °C, 16 Stunden nach Herstellerangaben abgespalten. Die Protease konnte über

ihren 6xHistidin-Tag anschließend über eine Nickelsäule mit einem Volumen von 100 µl abgetrennt werden. Das Proteingemisch wurde anschließend 16 Stunden gegen den für die spätere Kristallisation zu nutzenden Puffer dialysiert. Um den geschnittenen Strep-Tag sowie ungeschnittenes Fusionsprotein abzutrennen, wurde diese Proteinlösung nach der Dialyse nochmals über eine Strep-Tactin-Säule gegeben. Die Proteinlösung wurde nach der zweiten Reinigung über Ultrafiltration aufkonzentriert und wenn für die Kristallisation zu nutzen in einem weiteren Schritt anaerob über eine präparative Gelpermeationschromatographie gereinigt. Das gereinigte Protein wurde ebenfalls nochmals über eine SDS-PAGE analysiert.

### **3.9.8 Heterologe Produktion und Reinigung von *Bacillus subtilis* ResD/E**

ResD und ResE aus *B. subtilis* wurden als Fusion mit einem Strep-Affinitätstag gereinigt. Die entsprechenden Vektoren zur Überproduktion der Proteine wurden in den *E. coli* Stamm BL21CD+(DE3)-RIL (Stratgene, LA Jolla, USA) transformiert. Es wurden 500 ml LB-Medium, mit entsprechenden Antibiotika mit 5 ml einer Übernachtskultur inokuliert und bei 37 °C schüttelnd (180 upm) inkubiert. Bei Erreichen der Zelldichte OD<sub>578nm</sub> von 1 wurde die Proteinproduktion durch Zugabe von 300 nM IPTG-Lösung induziert und bei 25 °C inkubiert. Nach 3 Stunden Inkubation wurden die Zellen in einen Zentrifugenbecher mit O-Ring überführt und pelletiert (10 min, 5000g). Das Zellsediment wurde in 25 ml Puffer W resuspendiert. Der Zellaufschluss wurde mit Hilfe einer French Press (1500 p.s.i.) durchgeführt. Um Zelltrümmer und unlösliches Protein abzutrennen, wurde der Zellextrakt in einer 30000 upm zentrifugiert (Ja25.50, Beckman-Coulter, 4 °C, 1 h). Der Überstand wurde auf eine Strep-Tactin Säule mit 5 ml Säulenvolumen (IBA, Göttingen, Deutschland) aufgetragen, die zuvor mit 4 Säulenvolumen Puffer W äquilibriert worden war. Nach einem Reinigungsschritt von 10 Säulenvolumen (50 ml) mit Puffer W wurde das Protein mit zwei Säulenvolumen Puffer A (10 ml) von der Säule eluiert. Der Strep-Tag der gereinigten Proteine wurde mit 10 Units HRV 3C Protease (Novagen) pro mg Protein bei 25 °C, 16 Stunden nach Herstellerangaben abgespalten. Die Protease konnte über ihren 6xHistidin-Tag anschließend über eine Nickelsäule, mit einem Volumen von 100 µl abgetrennt

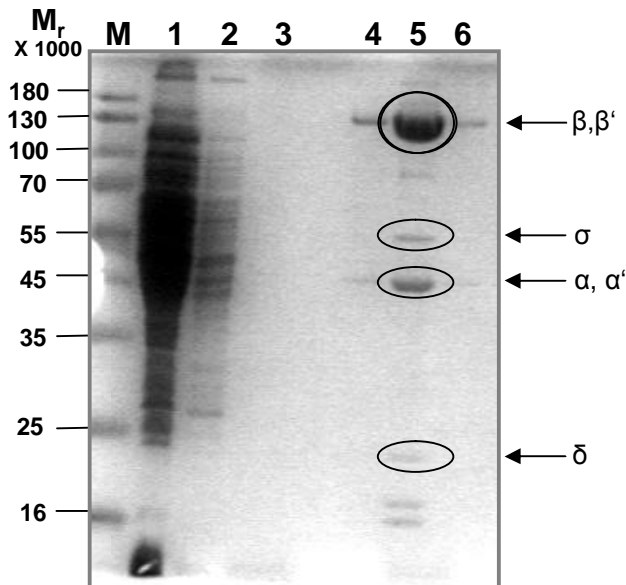
werden. Das Proteingemisch wurde anschließend gegen Puffer W mit 5 % Glycerin 16 Stunden dialysiert und bei -80 °C gelagert. Das Fusionsprotein wurde mittels SDS-Gelelektrophorese auf seine Reinheit geprüft.

### **3.9.9 Heterologe Produktion von *Bacillus subtilis* RNAP in *Bacillus subtilis***

Drei Liter LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika wurden mit 5 ml einer Übernachtskultur des *B. subtilis* Stamm MH5636 angeimpft und bei 37 °C schüttelnd (180 upm) inkubiert. Bei Erreichen der Zelldichte OD<sub>578nm</sub> von 2 wurden die Zellen in einen Zentrifugenbecher mit O-Ring überführt und pelletiert (10 min, 5000g). Darauf folgte ein Waschschriff mit dem Sonifikation-Puffer. Das Zellsediment wurde anschließend in 25 ml Resuspendierungspuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Vor dem Zellaufschluss durch Ultraschall wurde der Zellsuspension 1 mM PMSF hinzugefügt. Der Aufschluss durch Ultraschall erfolgte mit einem Zyklus von 3 x 5 min (Sonoplus HD2070MS, 50 % Impuls, 70 % Intensität, Kegelspitze MS72) realisiert. Um Zelltrümmer und unlösliches Protein abzutrennen, wurde der Zellextrakt zentrifugiert 30000 upm zentrifugiert (Ja25.50, Beckman-Coulter, 4 °C, 1 h). Der Überstand wurde auf eine Nickel-NTA Säule mit 1 ml Säulenvolumen (IBA, Göttingen, Deutschland) aufgetragen, die zuvor mit 4 Säulenvolumen Sonifikation-Puffer äquilibriert worden war. Nach einem Reinigungsschritt von 10 Säulenvolumen (10 ml) Sonifikation statt, fand eine Präelution mit 10 Säulenvolumen (10 ml) Präelutionspuffer-Puffer, um unspezifisch gebundenes Protein zu entfernen. Das Protein wurde mit vier Säulenvolumen Elutionspuffer (10 ml) von der Säule eluiert. Für weitere Arbeiten mit dem Proteinkomplex musste das im Elutionspuffer enthaltene Imidazol entfernt werden. Dafür wurde der Proteinkomplex gegen 2 x 1 l Storage Puffer bei 4 °C für je 16 und 2 h dialysiert.

Der Proteinkomplex wurde mittels SDS-Gelelektrophorese auf seine Reinheit geprüft (Abb. 13) und die Konzentration mittels 2-D Quant Kit (Amersham Bioscience USA) bestimmt.

|                                 |                       |
|---------------------------------|-----------------------|
| Sonifikation-Puffer:            | Für 200 ml            |
| 50 mM Tris-HCl (pH 7,8)         | 10 ml                 |
| 300 mM NaCl                     | 3,5 g                 |
| 5 mM MgCl <sub>2</sub>          | 1 ml                  |
| 20 % Glycerin                   | 40 ml                 |
| Resuspendierungspuffer:         | Für 25 ml             |
| Sonifikation-Puffer             | 25 ml                 |
| Lysozym                         | 100 mg                |
| Resuspendierungspuffer + Pellet | ca. 30 ml             |
| PMSF in 1 mM Endkonzentration   | 53 mg in 1 ml<br>ETOH |
| Präelutions-Puffer:             | Für 10 ml             |
| Sonifikation-Puffer             | 10 ml                 |
| 30 mM Imidazol                  | 20 mg                 |
| Elutionspuffer:                 | Für 10 ml             |
| Sonifikation-Puffer             | 10 ml                 |
| 200 mM Imidazol                 | 136 mg                |
| Storage Puffer:                 | Für 2 l               |
| 10 mM Tris-HC (pH 8,0)          | 20 ml                 |
| 10 mM MgCl <sub>2</sub>         | 20 ml                 |
| 100 mM KCl                      | 200 ml                |
| 0,1 mM EDTA                     | 0,4 ml                |
| 50 % Glycerin                   | 1 l                   |



**Abb. 13: Rekombinante Darstellung der RNAP aus *B. subtilis*.** Gezeigt sind drei Waschschrte der Aufreinigung der RNAP aus *B. subtilis* (Spur 1-3), sowie drei Elutionsfraktionen (Spur 4-6). Spur M zeigt die Trennung von Markerproteinen (Protein Molecular Weight Marker, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Die relative molekulare Masse ist angegeben. Der Zellextrakt wurden nach Zugabe von SDS-PAGE-Probenpuffer 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend durch ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel getrennt. Die Proteine wurden durch Coomassie Brilliant Blau-Färbung sichtbar gemacht.

### 3.9.10 Konzentrieren von Proteinlösungen

Die gereinigten Proteine wurden durch Ultrafiltration auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Für die Ultrafiltration wurde eine Amicon 10 ml Zelle (Millipore), sowie eine Membran mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa (Biomax Ultrafiltrations-Membranscheiben, PBGC, Biomax aus Polyethersulfon, Milipore) genutzt. Die Zelle wurde mit 2,5 bar Stickstoff begast bis ein minimales Volumen der Proteinlösung von 500 µl erreicht wurde.

### 3.9.11 Dialyse von Proteinlösungen

Die Dialyse der Proteinlösungen wurde zweimal gegen das 500fache Volumen durchgeführt. Einer ersten Dialysezeit von 16 Stunden, folgte nach einem Pufferwechsel eine Dialysezeit von 2 Stunden. Die Dialyse wurde volumenabhängig mit Mikro-Dialysierkapsel QuixSep 1 ml und Dialyseschlauch Typ 27/32 von Roth oder nur im Dialyseschlauch mit einem Ausschlussvolumen von 14 kDa durchgeführt.

### **3.9.12 Proteinbestimmung**

Die Proteinbestimmung wurde mit Hilfe 2-D Quant Kit (Amersham Bioscience USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Standard wurde hierbei BSA verwendet. Jede Proteinbestimmung wurde doppelt durchgeführt

### **3.9.13 Eisenbestimmung**

Der Eisengehalt wurde mit der Methode nach Lovenberg (Lovenberg *et al.*, 1963) ermittelt. Hierzu wurden 100 µl Proteinlösung mit 10 µl konzentrierter Salzsäure versetzt und mit Wasser auf 500 µl aufgefüllt. Anschließend wurde der Ansatz 10 Minuten bei 80 °C inkubiert und darauf für weitere 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Das präzipitierte Protein wurde in einer Eppendorf-Zentrifuge für 10 min bei 15 000 upm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 100 µl einer 1 M Hydroxylaminhydrochloridlösung, 500 µl ethanolische Phenanthrolinlösung (0,3%ig (w/v)) sowie 500 µl Wasser zugegeben. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurde die Absorption der Lösung bei  $\lambda = 512$  nm bestimmt. Der Eisengehalt konnte durch Vergleich mit einer parallel erstellten Kalibrierkurve eines Eisenstandards in verschiedenen Konzentrationen (Merck, Darmstadt, Deutschland) ermittelt werden. Jede Eisenbestimmung wurde doppelt durchgeführt.

### **3.9.14 UV-VIS Absorptionsspektroskopie**

Spektren des gereinigten Fnrs (150 µM) im UV-VIS Bereich (280 bis 800 nm) wurden mit Hilfe eines Jasco V-550 Spektralphotometer (Jasco, Deutschland) aufgenommen.

### **3.9.15 $\beta$ -Galaktosidase Enzymtest**

Das Zellsediment aus 2 ml Bakterienkultur wurde in 1 ml Z-Puffer resuspendiert. Zweihundert µl dieser Zellsuspension wurde zur Messung der OD<sub>578nm</sub> verwendet. Zu den übrigen 800 µl wurden 5 µl Lysozym-DNase-Lösung zugegeben und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Um die Reaktion zu



starten, wurden 200 µl 2-Nitrophenol-β-D-Galaktopyranosid-Lösung (4 mg/ml) zum Ansatz gegeben. Bei Eintritt einer Gelbfärbung wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung beendet und die Reaktionszeit notiert. Anschließend wurde die Absorption bei 420 und 550 nm photometrisch bestimmt. Die Aktivität der β-Galaktosidase wird so in Miller Units ausgedrückt (Miller, 1972). Jeder Enzymtest wurde doppelt durchgeführt.

$$U = \frac{1000 \cdot A_{420} (1,75 \cdot A_{550})}{V \cdot t \cdot OD_{578}}$$

*U = Miller Units*

*A<sub>420nm</sub> = Absorption des Reaktionsansatzes bei 420 nm*

*A<sub>550nm</sub> = Absorption des Reaktionsansatzes bei 550 nm*

*V = Volumen der Bakteriensuspension [ml]*

*t = Reaktionszeit [min]*

*OD<sub>578nm</sub> = Optische Dichte der Bakteriensuspension bei 578 nm*

|                        |          |   |
|------------------------|----------|---|
| Z-Puffer (pH 7,0):     | 60 mM    | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O |
|                        | 40 mM    | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O   |
|                        | 10 mM    | KCl   |
|                        | 1 mM     | MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O                |
|                        | 50 mM    | β-Mercaptoethanol                                     |
| DNaseI-Lösung:         | 10 µl/ml | Natriumacetat (3 M) pH 4,8                            |
|                        | 25 mg/ml | DNaseI  |
| Lysozym-DNaseI-Lösung: | 7 mg/ml  | Lysozym in Z-Puffer                                   |
|                        | 50 µg/ml | DNaseI-Lösung   |

### 3.9.16 Analytische Gelpermeationschromatographie (GPC)

Mittels Gelpermeationschromatographie können Moleküle nach ihrer nativen molekularen Masse und Form getrennt werden. Das Säulenmaterial besteht aus porösen Kügelchen aus hochvernetztem Agarosegel mit kovalent gebundenem Dextran. Für die in dieser Arbeit durchgeführte analytische GPC zur Bestimmung der nativen Molekularmasse eines Proteins wurde eine Superdex 200 HR 10/30-Säule von Amersham Biosciences (Piscataway, USA,  $V_t = 24$  ml, Trennleistung: 10000 - 600000  $M_r$ ) verwendet. Kleine Moleküle können in die Säulenmatrix diffundieren und haben dadurch eine größere Verweildauer auf der Säule als große Moleküle, die mit dem Laufpuffer schnell von der Säule eluieren. Die Trennung erfolgte aerob und anaerob bei RT mit Puffer W. Für die anaerobe Trennung wurde Puffer W anaerobisiert. Die Flußrate betrug 0,4 ml/min. Es wurden 100  $\mu$ l einer 150  $\mu$ M Fnr-Lösung auf die Chromatographiesäule aufgetragen. Durch separate Eichläufe mit Eichproteinen bekannter nativer molekularer Masse konnte die  $M_r$  des zu untersuchenden Proteins bestimmt werden.

### 3.9.17 Präparative Gelpermeationschromatographie (GPC)

Um das FnrCCCC aus *G. stearothermophilus* für die Kristallisation nach der Affinitätsreinigung weiter zu reinigen, folgte eine präparative Gelpermeationschromatographie. Für die in dieser Arbeit durchgeführte präparative GPC zur Reinigung des FnrCCCC wurde eine HiLoad Superdex 200 26/60 prep grade von Amersham Biosciences mit einem Säulenvolumen von 320 ml verwendet. (Trennleistung: 10000 - 600000  $M_r$ ). Das Prinzip der präparativen GPC ist vergleichbar mit dem Prinzip der analytischen GPC. Die Trennung erfolgte unter anaeroben Bedingungen bei RT mit anaerobisierten Puffer W oder Kristallisationspuffer 1, 2 oder 3 (Kap. 3.9.18). Die Flußrate betrug 2,0 ml/min. Die Fnr-Lösung wurde auf 2 ml durch Ultrafiltration konzentriert und auf die Chromatographiesäule aufgetragen. Der Durchfluß wurde in 15 ml Fraktionen aufgefangen. Fraktionen in denen das Fnr vorhanden war wurden vereinigt, die Proteinkonzentration bestimmt und die Proteinlösung durch Ultrafiltration erneut auf die gewünschte Konzentration gebracht.

### 3.9.18 Kristallisation

Um geeignete Kristallisationsbedingungen für das FnrCCC aus *B. subtilis* oder das FnrCCCC aus *G. stearothermophilus* zu finden, wurden Kristallisationsansätze nach dem "Sitting Drop" Verfahren in "96-Well Sitting Drop" Platten (Firma Nunc, New York, USA) mit den Screens von Nextal (Quiagen GmbH, Deutschland) EasyXtal Classics Lite Suite, EasyXtal Classics Suite, EasyXtal Classics II Suite, EasyXtal Cryos Suites, EasyXtal ComPas Suite, EasyXtal JCSG Core Suite I, EasyXtal JCSG Core Suite II, EasyXtal JCSG Core Suite III, EasyXtal JCSG Core Suite IV, EasyXtal JCSG+ Suite, EasyXtal MbClass II Suites, EasyXtal MPD Suite, EasyXtal PACT Suite und EasyXtal PEGs Suite eingesetzt. Dazu wurden jeweils 90 µl der entsprechenden Lösung in das Reservoir gegeben und ein Tropfen bestehend aus 1 µl Proteinlösung (5-10 mg/ml) mit 1 µl Reservoirlösung in die vorgesehene Vertiefung gesetzt. Durch die Einstellung eines thermodynamischen Gleichgewichts und eine damit verbundene Diffusion von Wasser aus dem Proteintropfen in das Reservoir, kam es zur Konzentrierung und im geeigneten Fall zur Kristallisation des Proteins.

Die "Hanging Drop" Methode wurde zur Optimierung zuvor positiv identifizierter Kristallisationsbedingungen eingesetzt. Dafür wurden Kristallisationsschalen mit 24 Vertiefungen mit 500 µl der entsprechenden Reservoirlösung gefüllt. Auf einem Deckgläschen (Durchmesser: 18 mm) wurden Tropfen mit 1 µl Proteinlösung (10 mg/ml) und 3 µl Reservoirlösung, Tropfen mit 2 µl Proteinlösung (10 mg/ml) und 2 µl Reservoirlösung, sowie Tropfen mit 3 µl Proteinlösung (10 mg/ml) und 1 µl Reservoirlösung aufgetragen. Anschließend wurde das Deckgläschen invertiert auf den mit Silikon bestrichenen Rand des Reservoirs aufgesetzt.

Für die Kristallisation lag das FnrCCC aus *B. subtilis* oder das FnrCCCC aus *G. stearothermophilus* in verschiedenen Puffern vor. Alle Kristallisationsansätze wurden unter anaeroben Bedingungen mit anaerobisierten Puffern und Lösungen angesetzt und bei 17 °C gelagert. Der Erfolg der Kristallisation wurde nach 3 Tagen und danach wöchentlich überprüft.

|                           |        |                   |
|---------------------------|--------|-------------------|
| Kristallisationspuffer 1: | 25 mM  | Tris-HCl (pH 8,0) |
|                           | 100 mM | NaCl              |
|                           | 5 mM   | DTT               |
| Kristallisationspuffer 2: | 50 mM  | Tris-HCl (pH 8,0) |
|                           | 75 mM  | NaCl              |
|                           | 5 mM   | DTT               |
| Kristallisationspuffer 3: | 25 mM  | HEPES (pH 8,0)    |
|                           | 100 mM | NaCl              |
|                           | 5 mM   | DTT               |

### 3.9.19 Protein-Oligonukleotid Kokristallisation

Hybridisierte Oligonukleotide (Kap. 3.8.15) wurden in 1,5 molaren Überschuss zu einer FnrCCCC Proteinlösung (8 mg/ml) in Kristallisationspuffer 2 gegeben und für 30 min inkubiert. Für die Kokristallisation wurde der Screen EasyXtal Nucleix Suite, welcher speziell für die Kristallisation von Protein-DNA-Komplexen entwickelt worden ist, eingesetzt. Die Kristallisationsexperimente wurden nach der Sitting drop Methode durchgeführt, wobei 1 µl des Protein-DNA-Gemischs mit 1 µl Kristallisationspuffer vermischt wurde. Das Reservoir wurde mit 90 µl Kristallisationspuffer befüllt. Alle Kristallisationsansätze wurden unter anaeroben Bedingungen mit anaerobisierten Puffern und Lösungen angesetzt und bei 17 °C gelagert. Der Erfolg der Kristallisation wurde nach 3 Tagen und danach wöchentlich überprüft.

### 3.9.20 *in vitro* Transkription

Als Matrize der *in vitro* Transkription diente ein PCR-Produkt mit einer Größe von 272 bp (Position -210 bis +62 relativ zum Transkriptionsstartpunkt des *narG*-Gens), das in einer Standard-PCR mit den Primern HR118 und EH19 (Kap. 3.8.10) von chromosomaler DNA des *B. subtilis* Stamms JH642 generiert worden war. Zur Reinigung wurde das Produkt in einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch von der chromosomalen DNA getrennt und anschließend über eine Gelextraktion (Qiagen, Hilden, Deutschland, Kap. 3.8.13) gereinigt. 10 ng

des gereinigten Fragments wurden ohne und mit 1,6  $\mu\text{M}$  anaerob gereinigtem FnrCCC bzw. FnrG64A, sowie 50 nM gereinigter RNAP (Kap. 3.9.9) für 15 min unter anaeroben Bedingungen bei RT mit 1fach konzentrierten *in vitro* Transkriptionspuffer inkubiert. Die Transkription wurde durch Zugabe von jeweils 100  $\mu\text{M}$  ATP, GTP, UTP sowie 10  $\mu\text{M}$  CTP und 0,5  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]CTP (= 3000 Ci/mmol; Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland) initiiert. Nach 20 minütiger Inkubation bei RT folgte eine Inkubation für weitere 15 min bei 37 °C. Der Reaktionsansatz mit einem Volumen von 10  $\mu\text{l}$  wurde durch Zugabe von 4  $\mu\text{l}$  stop solution (usb) gestoppt. Die Transkripte wurden in einem 7 M Harnstoff-8 % Polyacrylamid Gel analysiert (Kap. 3.9.5). Als Größenstandart wurde der Decade Marker verwendet, der nach Vorschrift der Firma Ambion (Ambion Inc., Austin, USA) hergestellt wurde. Zur Detektion wurde ein Röntgenfilm für 20 Stunden aufgelegt (BioMax MR Film, Kodak, New York, USA).

|                       |                      |  |
|-----------------------|----------------------|--|
| 1fach <i>in vitro</i> |                      |  |
| Transkriptionspuffer: | 25 mM                | Tris-HCl pH 7,5                              |
|                       | 100 mM               | KCl  |
|                       | 5 mM                 | MgCl <sub>2</sub>                            |
|                       | 5 %                  | Glycerin                                     |
|                       | 1 mM                 | DTT  |
|                       | 0,8 U/ $\mu\text{l}$ | RNaseOut (Invitrogen,<br>Karlsruhe, Germany) |

### 3.9.21 DNaseI Footprint Analyse

Für die DNaseI Footprint Analysen wurden verschiedene Promotorfragmente durch PCR amplifiziert: ein 310 bp *narG*-Promotorfragment (-210 bis +100 relativ zum Transkriptionsstartpunkt) mit Digoxigenin (DIG) und nicht Digoxigenin markierten Primern EH176 und EH177, ein 378 bp *ywcJ*-Promotorfragment (-176 bis +202 relativ zum Transkriptionsstartpunkt) mit einem DIG markierten Primer EH20 und einem nicht DIG markierten Primer EH21, ein 251 bp *a/sS*-Promotorfragment (-200 bis +51 relativ zum Transkriptionsstartpunkt) bzw. ein 323 bp *a/sS*-Promotorfragment mit dem DIG markierten Primer EH175 und dem nicht DIG markiertem Primer EH174 bzw.

mit dem DIG markierten Primer EH234 und dem nicht DIG markiertem Primer EH235, ein 234 bp *nark*-Promotorfragment (-140 bis +94 relativ zum Transkriptionsstartpunkt) über die DIG und nicht DIG markierten Primer EH178 und EH179, ein 300 bp *ldh*-Promotorfragment (-147 bis +153 relativ zum Transkriptionsstartpunkt) mit den DIG markierten und nicht DIG markierten Primer EH180 und EH181. Fünfunddreißig ng DIG markierter PCR Fragmente wurden sowohl ohne Protein als auch mit *B. subtilis* FnrCCC, FnrD63A, FnrG64A, FnrS153A, FnrL155A, FnrR157A, FnrD141A, FnrR189V, FnrE190A, sowie *G. stearothermophilus* FnrCCCC mit einer Konzentration von 0,5, 1 und 1,9 µM in 20 µl DNA-binding Puffer inkubiert. Es folgte eine Inkubation für 40 min bei RT. Die PCR Produkte wurden mit DNaseI (Roche, Mannheim, Germany) für 20 Sekunden behandelt und die Reaktion mit 50 µl Stopp solution (usb) terminiert. Für die vergleichende Sequenzierreaktion wurden die gleichen DIG markierten Primer, wie für die Generierung der PCR Fragmente eingesetzt. Die Fragmente wurden mit einem Sequenzierungskit (Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit, usb) nach Angaben des Herstellers sequenziert. Die DNA Fragmente wurden durch ein 7 M Harnstoff-6 % Polyacrylamid Gel aufgetrennt (Kap. 3.9.5) Anschließend wurden sie für 2 Stunden auf eine positiv geladene Nylon Membran geblottet und durch UV-Crosslinking fixiert. Die Detektion der DIG markierten Fragmente erfolgte durch CDP-Star (Roche, Mannheim, Germany) als Chemolumineszenzsubstrat (Engler-Blum *et al.*, 1993).

|                   |        |                   |
|-------------------|--------|-------------------|
| DNA-binde Puffer: | 25 mM  | Tris-HCl pH 7.5   |
|                   | 100 mM | KCl               |
|                   | 5 mM   | MgCl <sub>2</sub> |
|                   | 5 %    | Glycerin          |
|                   | 1 mM   | DTT               |

### 3.9.22 Chromatin affinity purification (ChAP)

Für die ChAP Analyse wurden 400 ml SMM-Medium in 1 l Erlenmeyerkolben und 500 ml Anaerobenflaschen mit Septum mit einer Übernachtskultur der *B. subtilis* Stämme IGB24 und IGB26 inokuliert, um eine Start OD<sub>578nm</sub> von 0,05

bei aerob kultivierten Zellen oder 0,3 bei anaerob kultivierten Zellen zu erreichen. Die Zellen wurden bei 37 °C und 180 upm für das aerobe Wachstum, sowie 100 upm für das anaerobe Wachstum kultiviert. Bei einer optischen Dichte von OD<sub>578nm</sub> von 0,8 wurden die Zellen 30 min mit 4 % Paraformaldehyd (final Konz. 0,6 %) bei 180 upm inkubiert. Die anaerob kultivierten Zellen wurden hierfür in ein Anaerobenzelt eingeschleust und Paraformaldehyd, welches in zuvor anaerobisiertem Puffer gelöst worden ist, wurde hinzugegeben. Nach der Zugabe wurden auch diese Ansätze 30 min schüttelnd bei 100 upm inkubiert. Nach der Inkubation wurde 500 mM Glycin in das Medium gegeben, um die Vernetzung zu stoppen. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (20 min, 5000 g, Beckman Coulter). Zum Waschen der Zellen wurde das Zellpellet in 200 ml Puffer W resuspendiert und nochmals pelletiert (20 min, 5000g). Nach diesem Schritt konnten die Zellsedimente bei -20 °C gelagert werden. Zur weiteren Verarbeitung wurden sie in 1 ml Puffer W resuspendiert und der Zellaufschluss mit Hilfe einer FastPrep®-24 Instrument Homogenisator (MP Biomedical) durchgeführt (Kap. 3.9.23). Um Zelltrümmer zu entfernen, wurde der Zellextrakt 30 min bei 13000 upm (Biofuge fresco, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 15 ml Falcongefäß überführt und das Volumen mit Puffer W auf 3 ml erhöht. Darauf folgte das Scheren der DNA mit Ultraschall (3.9.24). Nach dem letzten Zyklus wurden 10 µl der Suspension auf ein Agarosegel aufgetragen, um die Fragmentgröße der gescherten DNA von 500 – 1000 Basen sicherzustellen. Entsprechend der gewünschten Größe, musste die Ultraschall Behandlung fortgesetzt werden bis die entsprechende Fragmentgröße erreicht war. Der Überstand wurde auf eine Strep-Tactin Säule (Säulenvolumen 500 µl) aufgetragen, die zuvor mit Puffer W äquilibriert worden war. Nach einem Waschschriff von 5 Säulenvolumen (2,5 ml) mit Puffer W wurde der Protein-DNA-Komplex mit drei Säulenvolumen Puffer E (1,5 ml) von der Säule eluiert. Zum Aufheben der Vernetzung wurden die Elutionsfraktionen 16 h bei 65 °C inkubiert. Die DNA wurde anschließend mit Hilfe eines PCR Purifikation Kit (Qiagen) gereinigt und in 100 µl Wasser eluiert. 1 µl dieser gereinigten DNA wurde in einen PCR Ansatz eingesetzt.

|                      |        |               |
|----------------------|--------|---------------|
| 4 % Paraformaldehyd: | 4 %    | Paraformaldyd |
|                      | 100 mM | PBS pH 8      |

### **3.9.23 Zellaufschluss durch FastPrep®-24**

Die Zelllyse für die Chap Analyse erfolgte durch mechanische Behandlung im FastPrep®-24 Instrument Homogenisator (MP Biomedical). Dafür wurde eine Lysing Matrix aus Kalknatronglas (Worff Glaskugeln GmbH) mit einem Durchmesser von 45 – 38 µm eingesetzt. Pro Ansatz wurde in einem 2 ml Eppendorfgefäß 600 mg dieser Matrix und 1 ml in Puffer W resuspendierte *B. subtilis* Zellen vereinigt. Die Ansätze wurden zweimal im FastPrep®-24 Instrument Homogenisator bei einer Geschwindigkeit von 6,5 m/s jeweils 45 s mechanisch behandelt. Nach jedem Zyklus erfolgte eine Pause bei 4 °C für 2 min, um der entstandenen Reibungswärme entgegenzuwirken.

Der Zellaufschluss erfolgt durch schnelle Bewegungen des Homogenisators. Diese Bewegungen werden auf die Kugeln übertragen und es entstehen Scherkräfte, die den mechanischen Aufschluss der Zellen bewirken. Nach dem zweiten Aufschluss wurden die Ansätze für 30 min bei 13000 upm (Biofuge fresco, Hereaus) zentrifugiert und der Überstand für die weitere Verarbeitung genutzt.

### **3.9.24 Ultraschallbehandlung zum Fragmentieren von quervernetzter DNA**

Die Fragmentierung der quervernetzten DNA erfolgte mittels Ultraschall bei den Geräteeinstellungen (Sonoplus HD2070MS) 50 % Impuls und 70 % Intensität. Der Energieeintrag wurde durch die Kegelspitze MS72 realisiert. Die Beschallungsdauer betrug 4 x 1 min unter Eiskühlung. Nach jedem Zyklus erfolgte eine Pause von 2 min bei 4 °C, um der entstandenen Reibungswärme entgegenzuwirken. Um den Erfolg der Fragmentierung zu überprüfen wurden 10 µl, der Probe auf ein Agarosegel aufgetragen und die Größe der entstandenen Fragmente überprüft.

### **3.9.25 Mößbauerspektroskopie mit gereinigtem Protein**

Für die Mößbauerspektroskopie mit gereinigtem Protein wurde das Konstrukt pHRB2*fnr*CCC in *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RIL Zellen gebracht. Die Zellen



wurden in einem für die Mößbauerspektroskopie modifiziertem SMM-Medium mit  $34 \mu\text{M } ^{57}\text{FeCl}_3$  kultiviert. Die Reinigung des Proteins geschah nach Kap 3.6.9. Das gereinigte FnrCCC aus 10 l Kultur wurde durch Ultrafiltration auf eine Konzentration von 1 mM (Fnr=20 mg/ml) bei einem Volumen von 200  $\mu\text{l}$  gebracht. Die Proteinlösung wurde unter anaeroben Bedingungen in ein Mößbauergefäß gegeben und in flüssigem Stickstoff gefroren. Das Mößbauerspektrum wurde bei einer Temperatur von 77 K in Kooperation mit Prof. Trautwein, Universität Lübeck aufgenommen.

### Mößbauer (modifiziertes SMM)-Medium:

|  |                   |   |
|--|-------------------|---|
| Mößbauer-Basis <sup>*2</sup> :                     | 2,0 mM            | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$                            |
|  | 80,0 mM           | $\text{K}_2\text{HPO}_4$                                |
|  | 44,0 mM           | $\text{Na}_3\text{Citrat} \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ |
|  | 7,5 mM            | $\text{NaCl}$   |
| 10 x Mößbauer-Mix <sup>*2</sup> :                  | 800 $\mu\text{M}$ | L-Phenylalanin  |
|  | 4 mM              | L-Cystein   |
|  | 1,0 mM            | L-Tryptophan  |
|  | 1,5 mM            | Thiaminchloridhydrochlorid                              |
|  | 20,0 mM           | D(+)-Glucose-Monohydrat                                 |
|  | 50,0 mM           | Pyruvat   |
| 100 x Mößbauer-Spurenelementlösung <sup>*2</sup> : | 79 mg/l           | $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$            |
|  | 100 mg/l          | $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$            |
|  | 40 mg/l           | $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$            |
|  | 60 mg/l           | $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$            |
|  | 60 mg/l           | $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$  |
|  | 170 mg/l          | $\text{ZnCl}_2$   |
| Casaminoacids-Lösung <sup>*2</sup> :               | 25,0 %            | Casaminoacids <sup>*1</sup>                             |

|   |        |                                    |
|---|--------|------------------------------------|
| NaNO <sub>3</sub> -Lösung <sup>*2</sup> : | 1 M    | NaNO <sub>3</sub>                  |
| MgSO <sub>4</sub> -Lösung <sup>*2</sup> : | 1 M    | MgSO <sub>4</sub>                  |
| Zusammensetzung des SMM-Mediums:          | 880 ml | Mößbauer-Basis                     |
|   | 100 ml | 10 x Mößbauer-Mix                  |
|   | 10 ml  | 100 x Mößbauer-Spurenelementlösung |
|   | 20 ml  | Casaminoacids-Lösung               |
|   | 10 ml  | 1 M NaNO <sub>3</sub> -Lösung      |
|   | 2 ml   | MgSO <sub>4</sub> -Lösung          |
|   | 34 µM  | <sup>57</sup> FeCl <sub>3</sub>    |

\*1 Eisenarme Casaminoacid-Lösung von Difco.

\*2 Mediumbestandteile werden in MilliQ Wasser gelöst

### 3.9.25.1 Herstellung einer <sup>57</sup>FeCl<sub>3</sub>-Lösung

Vierunddreißig mg <sup>57</sup>Fe werden in ein Eppendorfgefäß mit 600 µl konzentrierter HCl gegeben. Dieses Gemisch wird bei 80 °C 4-5 Tage inkubiert. Um Gasbildung zu vermeiden wird ein minimales Loch in den Deckel des Eppendorfgefäß eingebracht und mit Parafilm umschlossen. Die gelöste Eisenlösung wird anschließend tropfenweise unter Rühren in 600 mM Nitrilotriessigsäure gegeben, welche zuvor mit NaOH auf einen pH 5,0 eingestellt worden ist. Beim Eintropfen der Eisenlösung muss beachtet werden, dass der pH-Wert konstant zwischen 3 und 5 gehalten wird. 1,7 ml dieser Lösung werden zu 1 l Medium hinzugefügt.

### 3.9.26 Mößbauerspektroskopie mit ganzen Zellen

Für die Mößbauerspektroskopie mit ganzen Zellen wurden die Konstrukte pHRB2*fnr*, pHRB2*fnr*D141A und pHRB2*fnr*D141C in *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RIL Zellen gebracht. Mit 5 ml einer Übernachtskultur in LB wurden 500 ml Mößbauermedium, in 1 l Schikanekolben mit 34 µM <sup>57</sup>FeCl<sub>3</sub> inokuliert und bei 37 °C und 180 upm kultiviert. Bei Erreichen einer

OD<sub>578nm</sub> von 0,5 wurde die Proteinproduktion durch Zugabe von 100 µl/l Anhydrotetracyclin-Lösung (Konzentrat: 3 mg/ml) induziert. Nach einer Kultivierungsdauer von 16 Stunden, 25 °C und 180 upm wurden die Zellen für 3 Stunden unter anaeroben Bedingungen stehend kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde in einem Anaerobenzelt in Zentrifugenbecher mit O-Ring überführt und zentrifugiert (10 min, 5000g). Darauf folgte ein Waschschrift mit eiskaltem, anaerobisierten Mößbauerpuffer. Um ein dichtes Zellpellet zu erhalten, wurde die Zellsuspension für 30 min bei 20000 upm zentrifugiert (Ja25.50, Beckman-Coulter). 800 mg des Zellpellets wurden in einem Anaerobenzelt in ein Mößbauergefäß überführt und in flüssigem Stickstoff gefroren. Das Mößbauerspektrum wurde bei einer Temperatur von 70 K aufgenommen.

|                 |        |                   |
|-----------------|--------|-------------------|
| Mößbauerpuffer: | 100 mM | Tris-HCl (pH 8,0) |
|                 | 150 mM | NaCl              |
|                 | 10 %   | Glycerin          |
|                 | 5 mM   | DTT               |

## 4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 4.1 Die biochemische Charakterisierung des Regulators Fnr aus *Bacillus subtilis*

#### 4.1.1. Die Koordination des $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums des *Bacillus subtilis* Fnr

Das Fnr-Protein aus *B. subtilis* gehört zur Superfamilie der Crp/Fnr-Transkriptionsfaktoren. Für die Struktur der Mitglieder dieser Familie ist eine N-terminale Signalbindungsdomäne und eine C-terminale DNA-Bindungsdomäne charakteristisch. Diese Domänen sind über eine  $\alpha$ C-Helix verbunden, über die die Dimersierung der Proteine stattfindet (Körner *et al.*, 2003).

Für das Fnr aus *E. coli* konnte gezeigt werden, dass es unter anaeroben Bedingungen ein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum als Kofaktor besitzt, welches über die vier Cysteinreste Cys20, Cys23, Cys29 und Cys120 koordiniert wird. Bei steigender Sauerstoffkonzentration zerfällt dieses  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum durch Oxidation zu einem  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Zentrum und weiter zum Apo-Protein ohne Kofaktor (Green and Guest, 1993a, 1993b; Guest *et al.*, 1996; Khoroshilova *et al.*, 1997; Sharrocks *et al.*, 1990; Sutton *et al.*, 2004).

In früheren Untersuchungen am Fnr aus *B. subtilis* konnte gezeigt werden, dass es als sauerstoffsensitiver Redoxregulator im aktiven Zustand ebenfalls ein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum als Kofaktor besitzt. Mutationsanalysen ergaben, dass dieser Kofaktor nur über drei der sechs enthaltenen Cysteinreste koordiniert wird. Die für die Koordination verantwortlichen Cysteine liegen C-terminal in einem Cluster (Cys227, Cys230 und Cys235) vor, was der bestehenden Charakteristik der Transkriptionsfaktoren der Crp/Fnr-Superfamilie widerspricht. Die Natur des vierten Liganden ist bislang ungeklärt (Reents *et al.*, 2006a).

Für eine weitergehende Identifikation dieses Clusters wurde eine Mößbauerspektroskopie durchgeführt.

Da das Energieniveau eines Atom-Kerns von seiner Umgebung abhängig ist, kann mit Hilfe der Mößbauerspektroskopie die Koordinationsphäre des Eisenatoms untersucht werden. Ob ein zu untersuchendes Eisenatom über ein Schwefel-, Stickstoff- oder Sauerstoffatom gebunden ist, zeigt seine

Umgebende Elektronendicht und –verteilung. Gleicht man die Energiedifferenz an, gibt das Ergebnis Aufschluß über die Koordinationssphäre des Mößbaueratoms (hier das Eisenatom).

Bei der Mößbauerspektroskopie wird als Quelle ein radioaktives Nuklid verwendet, im Falle der Fe-Spektroskopie eine  $^{57}\text{Co}$ -Quelle mit einer Halbwertszeit von 280 Tagen. Beim Zerfall des Co-Kerns entsteht ein  $^{57}\text{Fe}$ -Kern im angeregten Zustand, der durch Emission eines  $\gamma$ -Quants in den Grundzustand übergeht.

Diese Analysemethode beruht auf dem Mößbauer- sowie dem Doppler-Effekt. Der Mößbauereffekt besagt, dass eine Quelle im angeregten Kernzustand während des Übergangs in den Grundzustand einen  $\gamma$ -Quant emittiert. Die Energie des  $\gamma$ -Quants wird von einem Absorber, der sich im Grundzustand befindet, rückstoßfrei absorbiert, wobei der Absorber in einen angeregten Zustand übergeht. Wichtig ist dabei, dass die Energiedifferenz (angeregter Zustand – Grundzustand) zwischen Quelle und Absorber gleich ist. Ist dieses nicht der Fall erfolgt keine Resonanz. Um die Energiedifferenz (Resonanzbedingung) anzugleichen, wird dem emittierten  $\gamma$ -Quant Doppler-Energie durch Bewegen der Quelle zugeführt (Doppler-Effekt).

Mößbauerspektren enthalten zwei unterschiedliche Informationen, die durch Wechselwirkungen zwischen Kern und Elektronen zustande kommen:

1. **Die Isomerieverschiebung  $\delta$**  (elektrische Monopol Wechselwirkung):

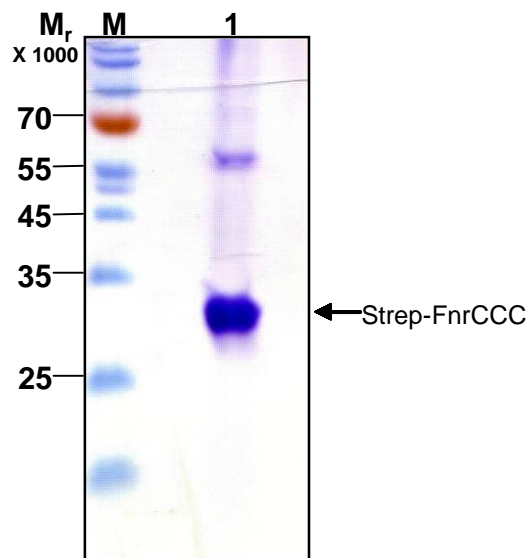
ist die relative Energieverschiebung zwischen Quelle und Absorber. Diese tritt auf, wenn die Elektronenkonfiguration von Quelle und Absorber unterschiedlich ist, wenn also die Eisen-Atome in Quelle und Absorber unterschiedliche chemische Bindungen eingehen. Daraus können Rückschlüsse über die Liganden gezogen werden.

2. **Die Elektrische Quadrupolwechselwirkung  $[\Delta E_Q]$ :**

Das Energieniveau des  $^{57}\text{Fe}$ -Kerns im angeregten Zustand spaltet sich symmetrisch in zwei Resonanzabsorptionen auf. Bei Ionen mit kugelsymmetrischer Ladungsverteilung wie  $\text{Fe}^{3+}$  erhält man eine kleine Quadrupolaufspaltung. Bei einer nicht kugelsymmetrischen Ladungsverteilung wie  $\text{Fe}^{2+}$  ist die Quadrupolaufspaltung groß. Dies gibt Aufschluss über die Molekülsymmetrie, den Oxidationszustand und die Koordination (Riedel, 2004).

Zur Analyse des FnrS aus *B. subtilis* über die Mößbauerspektroskopie wurde das Mutantenprotein FnrCCC genutzt. In diesem Protein wurden drei Cysteinreste, die nicht an der Koordination des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums beteiligt sind, durch Serinreste ausgetauscht. Dadurch erhöht sich die Stabilität des Proteins, da die Aggregation durch unspezifische Disulfidbrücken verhindert wird. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Protein aktiv ist (Reents *et al.*, 2006a).

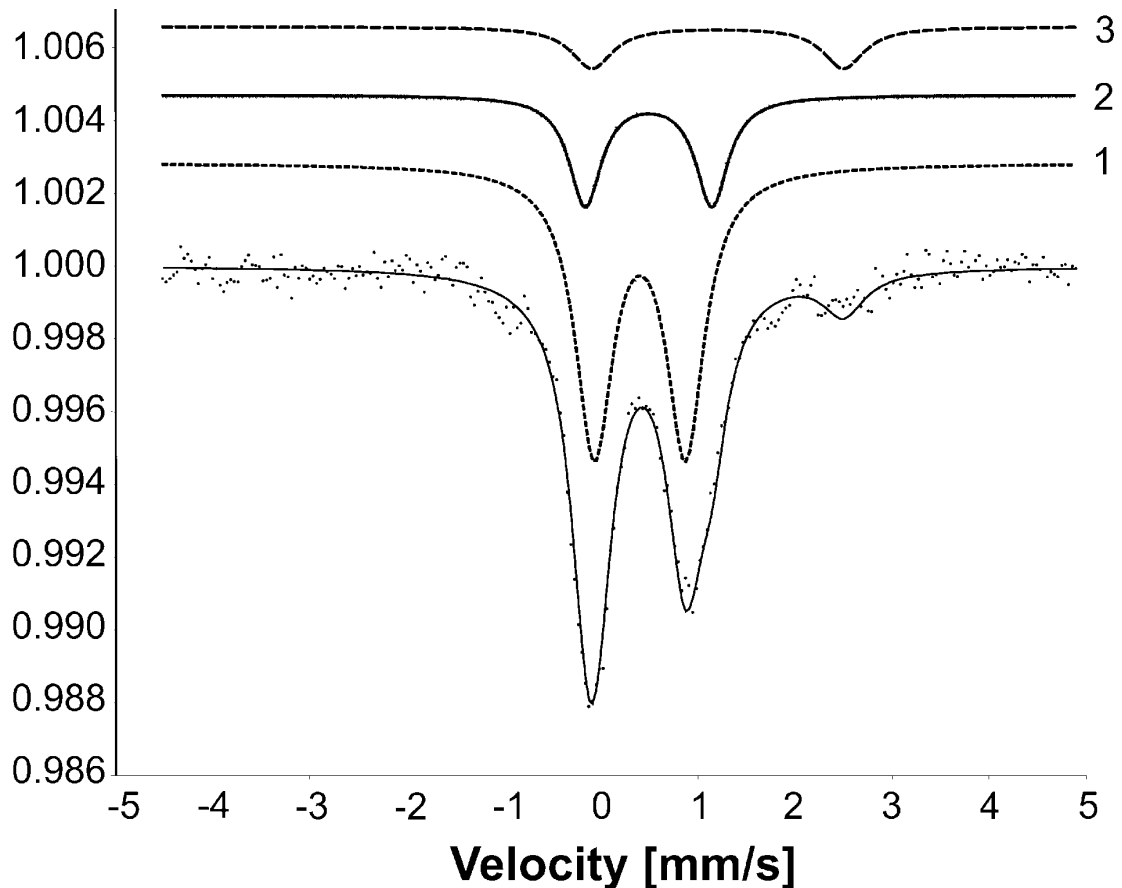
*E. coli* BL21C+ Zellen, welche das *fnrCCC*-Gen, dass in den Vektor pASK-IBA45+ (IBA, Göttingen) vorlag, exprimierten, wurden aerob in eisenarmem SMM-Minimalmedium kultiviert. Nach Zugabe von Anhydrotetracyclin zu den Zellen wurde FnrCCC produziert. Als alleinige Eisenquelle wurde dem Medium 34  $\mu\text{M}$   $^{57}\text{FeCl}_3$  zugesetzt. Nach 16-stündiger aeroben Proteinproduktion wurden die Zellen weitere drei Stunden anaerob kultiviert, um den anaeroben Einbau des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums zu gewährleisten. Im Anschluss erfolgte die anaerobe Reinigung des Proteins durch Affinitätschromatographie über eine Strep-Tactin Tropfsäule. 10  $\mu\text{l}$  Probe des Eluats wurde via SDS-PAGE auf Reinheit geprüft (Abb. 14), das Eluat über Membranfiltration auf eine Protein-Konzentration von 700  $\mu\text{M}$  konzentriert und anschließend in Kooperation mit Prof. Trautwein, Universität Lübeck, durch Mößbauerspektroskopie bei einer Temperatur von 77 K analysiert (Abb. 15) (Kap. 3.9.25).



**Abb. 14: Proteinreinigung des Strep-FnrCCC Fusionsproteins für die Mößbauerspektroskopie.** Die SDS-PAGE zeigt das gereinigte FnrCCC-Protein bei der erwarteten  $M_r$  28,4 kDa. Bei ca. 57 kDa ist eine zweite Bande zu erkennen, die der Größe eines Fnr-Dimers entspricht. Spur M zeigt die Trennung verschiedener Markerproteine, deren relative molekulare Masse (kDa) angegeben ist (Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Alle Proteine wurden mittels 13,2%iger SDS-PAGE getrennt und durch Coomassie-Blue Färbung sichtbar visualisiert.

Das gemessene Mößbauerspektrum kann in drei Subspektren unterteilt werden (Abb. 15). Subspektrum 1 und 2 zeigen eine Isomerieverschiebung von  $\delta = 0,4$  mm/s /  $0,49$  mm/s und eine Quadrupolaufspaltung von  $\Delta E_Q = 0,94$  mm/s /  $1,31$  mm/s (Abb. 15). Diese Parameter sind charakteristisch für ein  $[4Fe-4S]$ -Zentrum mit dem Oxidationszustand  $2+$ . 66,8 % des Signals repräsentieren Subspektrum 1 und 22,3 % des Signals repräsentieren Subspektrum 2. Dieses 3:1 Verhältnis spricht für ein  $[4Fe-4S]^{2+}$ -Zentrum, das über drei Cysteinreste und einen nicht-Cystein Liganden koordiniert wird.

Das Subspektrum 3 mit einer Fläche von 10,9 % und den Parametern  $\delta = 1,2$  mm/s und  $\Delta E_Q = 2,59$  mm/s repräsentiert freie  $Fe^{2+}$ -Ionen in der Probe (Reents *et al.*, 2006a).



**Abb. 15: Mößbauerspektroskopie des anaerob gereinigten FnrCCC Proteins aus *B. subtilis*.** Das Mößbauerspektrum wurde bei einer Temperatur von 77 K gemessen. Die Daten wurden durch Annäherung an eine Lorentzverteilung analysiert. Die Subspektren 1 und 2 entsprechen dem über Cystein und nicht-Cystein koordinierten Eisen. Das Subspektrum 3 zeigt freies  $\text{Fe}^{2+}$  (Reents *et al.*, 2006a).

Die unterschiedlichen  $\delta$  und  $\Delta E_Q$  Parameter repräsentieren die unterschiedlichen Koordinationsphären des Eisens, sowie die Koordination über Cystein- und nicht-Cystein-Liganden. Die Isomerieverschiebung für die nicht-Cystein koordinierte Komponente ist 0,1 mm/s höher als die Isomerieverschiebung der Cystein-koordinierten Komponente. Dies lässt darauf schließen, dass dieses Eisen über einen Liganden koordiniert wird, der eine schwächere kovalente Bindung ausbildet, wie etwa Stickstoff oder Sauerstoff (Layer *et al.*, 2005; Schünemann and Winkler, 2000a). Daher kämen als Liganden z.B. Histidin- oder Aspartatreste in Frage.

Dieses 3:1 Verhältnis wurde schon vorher für das  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum der Coproporphyrinogen-III-Oxidase (HemN) beschrieben (Layer *et al.*, 2005). In diesem Enzym ist das  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster über drei Cysteinreste koordiniert. Das vierte Eisen wird durch S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) gebunden.



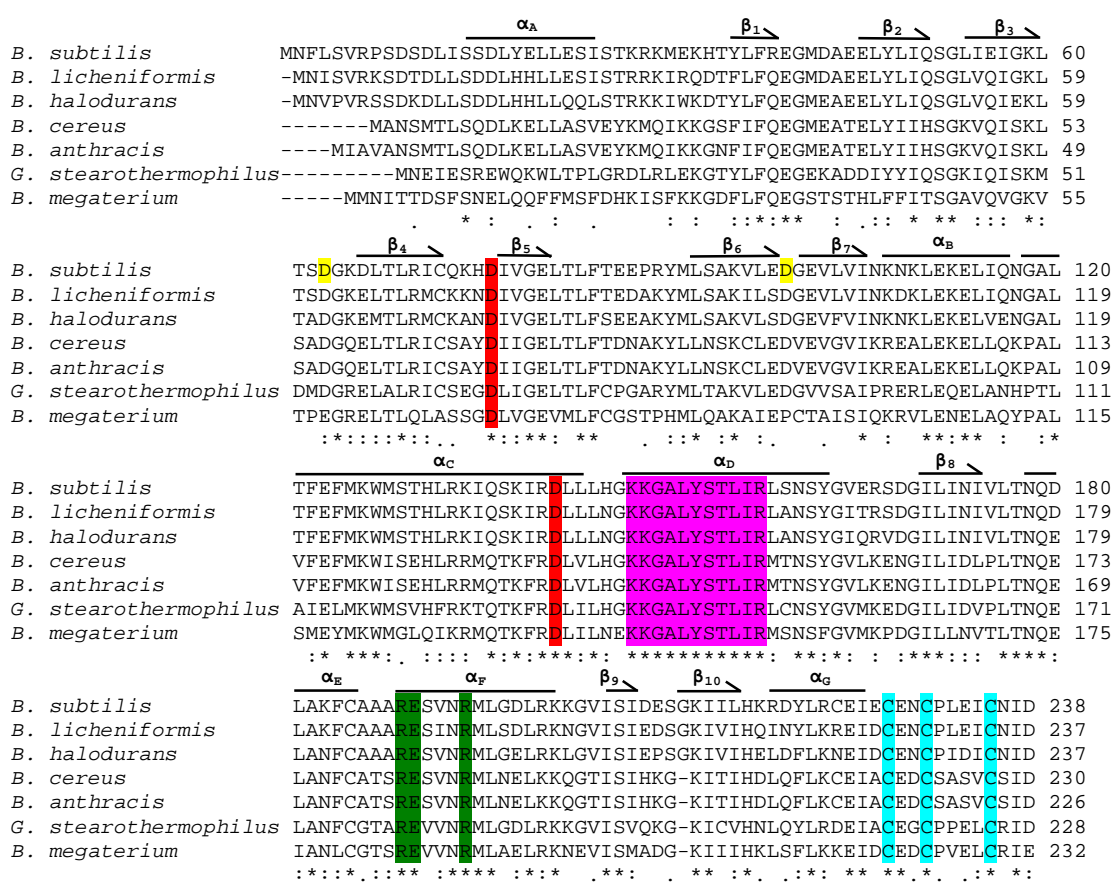
#### 4.1.2 Die Rolle der Aspartatreste des *Bacillus subtilis* Fnrs für die Koordination des $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums

Mögliche Kandidaten für den vierten Ligand des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums von *B. subtilis* Fnr sind Histidin- sowie Aspartatreste. Ein Beispiel dafür sind die "Rieske Cluster", die in Cytochromkomplexen vorkommen. Hier werden die Cluster durch zwei Cystein- und zwei Histidinreste am Protein fixiert (Frazzon and Dean, 2003). In der Natur finden sich weitere Beispiele einer solchen Koordination, wie z. B. die Ni-Fe-Hydrogenase und die 4-Hydroxybutyryl-CoA Dehydratase bei denen das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum über drei Cysteinreste und einen Histidinrest koordiniert wird (Britt *et al.*, 1991; Kimura *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2004; Volbeda and Fontecilla-Camps, 2005).

Das Fnr aus *B. subtilis* besitzt zwei Histidinreste (His131 und His216), die verglichen mit anderen Bacilli, hoch konserviert sind. Durch gerichtete Mutagenese dieser konservierten Histidinreste gegen einen Alaninrest, konnte jedoch gezeigt werden, dass diese nicht an der Koordination des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums beteiligt sind (Reents *et al.*, 2006a).

Eine weitere Möglichkeit der Koordination des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums ist die Möglichkeit über einen Aspartatrest. Ein Beispiel findet sich hier in der Koordination des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums eines Ferredoxins aus *Pyrococcus furiosus*, das über drei Cysteinreste und einen Aspartatrest koordiniert wird (Calzolari *et al.*, 1995).

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des Fnrs aus *B. subtilis* mit Fnr-Proteinsequenzen anderer Bacilli zeigt, dass von 15 vorhandenen Aspartatresten zwei hochkonserviert sind (Asp76 und Asp141) (Abb. 16).



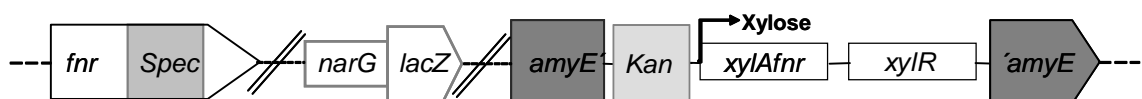
**Abb. 16: Alignment von Fnr Aminosäuresequenzen verschiedener Bacilli.** Vergleich der Fnr Proteine aus *B. subtilis* (NP\_391612.1), *Bacillus licheniformis* (CAA76344.1, 81 % identische Reste), *Bacillus halodurans* (NP\_241097.1, 76 % identische Reste), *Bacillus cereus* (AAP09089.1, 57 % identische Reste), *Bacillus anthracis* (NP\_655988.1, 58 % identische Reste), *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC12976 (Stamm), 57 % identische Reste). *Bacillus megaterium* (CP001982, 45,8 % identische Reste). Identische Reste sind mit Sternen markiert. Die konservierten Aspartatreste des Fnr sind rot, die nicht konservierten, aber später analysierten sind gelb markiert. Türkis markiert sind die drei konservierten Cysteinreste, die an der Koordination des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums beteiligt sind. Die Aminosäurereste des HTH-Motiv sind dunkelgrün, die konservierte Domäne ( $\alpha\text{D}$ ) rosa markiert. Die potentielle Sekundärstruktur ist durch Linien gekennzeichnet, wobei die  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter nummeriert angegeben sind.

Um den Einfluss der Aspartatreste auf die Koordination des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums des FnrS aus *B. subtilis* zu untersuchen, wurden die konservierten Aspartatreste Asp76 und Asp141 über gezielte Mutagenese durch Alaninreste ersetzt. Zusätzlich zu den konservierten Aspartatresten wurden die Aspartreste Asp63 und Asp99, die nur in *B. megaterium* nicht konserviert sind, durch einen Alaninrest ausgetauscht. Alanin wurde ausgewählt, da die Methylgruppe der Seitenkette keine Möglichkeit besitzt, Eisen oder andere Metalle zu komplexieren. Es können nur Aminosäuren eine koordinative Bindung mit Metallen eingehen, die einen Elektronendonator wie zum Beispiel Stickstoff, Sauerstoff oder Schwefel in der Seitenkette besitzen. Für die Substitution

würden auch noch andere Aminosäuren, die eine apolare, hydrophobe Seitenkette besitzen, wie z. B. Leucin, Isoleucin, Valin oder Phenylalanin, in Frage kommen. Diese wurden aber auf Grund ihres höheren sterischen Raumbedarfs im Gegensatz zu Alanin ausgeschlossen.

#### 4.1.2.1 Die Fnr-Aspartatmutante D141A komplementiert nicht das inaktivierte chromosomale *fnr*-Gen

Um den Einfluss der Aspartatreste des Fnr auf die *in vivo* Aktivität zu untersuchen, wurde ein *in vivo* Komplementationstests in einem *B. subtilis* Fnr-Knock-out-Stamm HRB3 (*fnr::spc narG-lacZ*) durchgeführt. Das *fnr*-Gen wurde durch die Insertion einer Spectinomycinresistenzkassette inaktiviert. Das nicht-mutierte *fnr*-Gen aus *B. subtilis*, sowie mutierte *fnr*-Gene, deren Expression unter Kontrolle eines Xylose-induzierbaren Promotors stehen, wurden durch homologe Rekombination in den *amyE*-Locus dieses Fnr-Knock-out-Stammes ( $\Delta fnr$ ) gebracht. Da bereits gezeigt werden konnte, dass in *B. subtilis* die anaerobe Expression von *narG* strikt von Fnr abhängt (Cruz-Ramos *et al.*, 1995), wurde die Fnr-Aktivität über die Expression der Fnr-abhängigen *narG-lacZ* Reportergenfusion gemessen (Abb. 17) (Reents *et al.*, 2006a).



**Abb. 17: Komplementation einer *B. subtilis* *fnr*-Mutante.** Das chromosomale *fnr*-Gen wurde durch eine Spectinomycinkassette inaktiviert. So kann dieser Knock-out durch Einbringen eines *fnr*-Gens komplementiert werden. Dazu wurde eine Fnr abhängige Reportergenfusion (*narG-lacZ*) eingebracht. Die Aktivität des zu untersuchenden *fnr*-Gen, das durch homologe Rekombination am *amyE*-Locus in das Genom integriert wurde und von einem xyloseabhängigen  $P_{xylA}$ -Promotor kontrolliert wird, kann so über die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität untersucht werden (modifiziert nach (Reents *et al.*, 2006a).

Der Einfluss der Aspartatreste von Fnr auf das  $[4Fe-4S]^{2+}$ -Zentrum wurde mit Hilfe des Komplementationssystem *in vivo* untersucht. Alle vier Aspartatreste des *B. subtilis* Fnr wurden einzeln über ortsgerichtete Mutagenese im *fnr*-Gen gegen Alaninreste ausgetauscht und in den Vektor pHRB1 kloniert. Diese vier Konstrukte wurden jeweils in den Stamm HRB3 (*fnr::spc; narG-lacZ*) gebracht. Die Kultivierung der Mutanten erfolgte anaerob in SMM-Medium mit 10 mM Nitrat. Die *fnr*-Expression wurde mit 2 % Xylose induziert und die

$\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der chromosomal integrierten *narG-lacZ* Reportegenfusion nach drei und sechs Stunden nach Animpfen bestimmt. Dieser Versuch wurde dreimal wiederholt. Die Standardabweichung betrug maximal 15 %. Die mit den Fnr-Mutanten gemessenen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten wurden mit der Aktivität des Wildtyp-Fnrs verglichen (Tabelle 6).

**Tabelle 6:**  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessung von *B. subtilis* Fnr, sowie Fnr Proteinen mit mutiertem Aspartatrest

| Stamm                | Relevanter Genotyp                              | $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität* <sup>1</sup> |     |
|----------------------|---|--|-----|
|                      |   | (Miller Units)                                 | [%] |
| <i>narG-lacZ</i>     |   |  |     |
| HRB3 <i>fnr</i>      | <i>fnr::spc amyE::P<sub>xyIA</sub>-fnr</i>      | 291  | 100 |
| HRB3 <i>fnrD63A</i>  | <i>fnr::spc amyE::P<sub>xyIA</sub>-fnrD63A</i>  | 11,3   | 3,9 |
| HRB3 <i>fnrD76A</i>  | <i>fnr::spc amyE::P<sub>xyIA</sub>-fnrD76A</i>  | 55   | 20  |
| HRB3 <i>fnrD99A</i>  | <i>fnr::spc amyE::P<sub>xyIA</sub>-fnrD99A</i>  | 93,5   | 32  |
| HRB3 <i>fnrD141A</i> | <i>fnr::spc amyE::P<sub>xyIA</sub>-fnrD141A</i> | <2   | <1  |

\*<sup>1</sup> Die *fnr*-Expression wurde in allen anaeroben Kultivierungen mit 2 % Xylose in SMM-Medium induziert. Zusätzlich enthielt das Medium 10 mM Nitrat. Die dargestellten Ergebnisse der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessung sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Die Standardabweichung betrug höchstens 15 %.

Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität des Fnr Wildtyps von 291 U (Miller Units) wurde auf 100 % gesetzt und die Aktivität der Fnr-Mutanten in Relation dazu. Die Fnr-Mutanten D76A und D99A zeigen 32 bzw. 20 % Aktivität, während die Fnr-Mutanten D141A und D63A mit einer  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität unter 5 % nicht mehr aktiv sind (Tabelle 6).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aspartatreste Asp63 und Asp141 wichtig für die Funktion des Fnr-Proteins sind. Dies könnte auf eine Beteiligung der ausgetauschten Aspartatreste an der Koordination des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums hinweisen. Vorherige Studien haben jedoch gezeigt, dass der Austausch einer Aminosäure, die an der Koordination des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums beteiligt ist, einen vollständigen Aktivitätsverlust des Regulators zur Folge hat (Reents *et al.*, 2006a). Dies liegt nur für die Mutation des Aspartatrests Asp141 im Fnr vor, da dieses zum Verlust der Expression des *lacZ*-Gens und folglich zum Verlust der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität führt. Die reduzierte Aktivität der Fnr-Mutanten Asp63 und D141 könnte allerdings auch auf strukturelle Änderungen der Tertiärstruktur des Fnr-Proteins zurückzuführen sein. Um die Beteiligung der

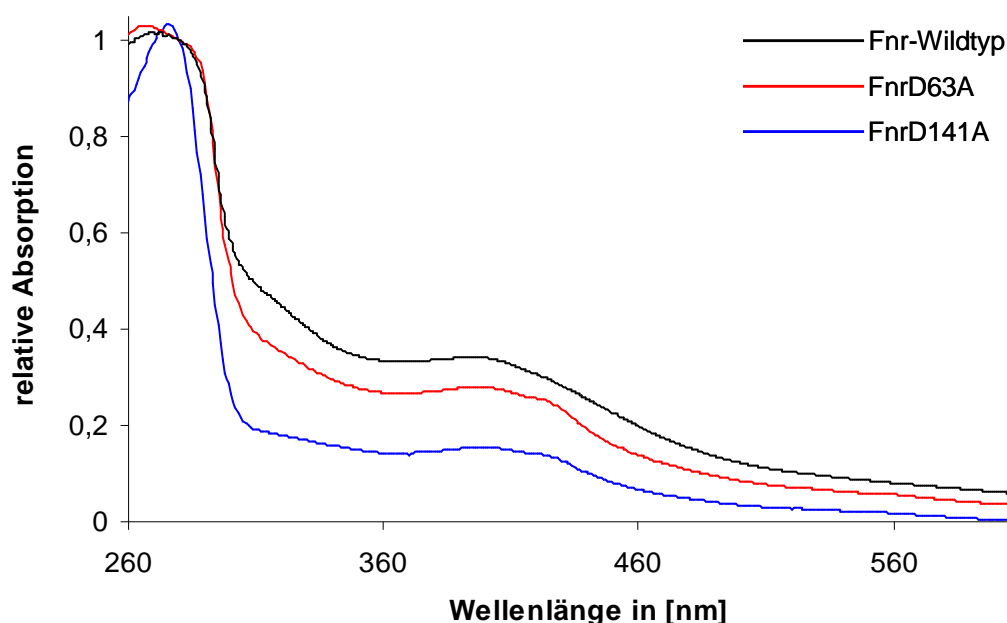
hochkonservierten Aminosäurereste Asp63 und Asp141 an der Koordination des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums weiter zu untersuchen, wurden die Proteine FnrD63A und FnrD141A produziert, chromatographisch gereinigt und spektroskopisch untersucht.

#### 4.1.2.2 Spektroskopische Untersuchungen von Fnr-Aspartatmutanten

Proteine, die ein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum koordinieren, zeigen im Spektrum vom ultravioletten bis sichtbaren Bereich (UV/VIS-Spektrum) eine charakteristische Absorption bei 410 nm (Casper *et al.*, 2004; Layer *et al.*, 2002). Der Quotient aus  $A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  wurde genutzt, um den Eisen-Schwefel Einbau des Wildtyp Fnr mit den mutierten Proteinen zu vergleichen (Casper *et al.*, 2004).

Mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie wurde untersucht, ob die konservierten Aspartatrete D141 und D63 im Fnr an der Koordination des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums beteiligt sind.

Das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum des gereinigten *B. subtilis* Fnr-Wildtypproteins zeigte im UV/VIS-Absorptionsspektrum eine Absorption bei 420 nm auf. Die Schulter war, verglichen mit der eines typischen  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums, um 10 nm verschoben (Reents *et al.*, 2006a). Das für alle Proteine typische Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm war ebenfalls vorhanden (Abb. 18). Der Quotient aus  $A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  gibt Aufschluss über die Einbaurrate des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums in das Fnr-Protein. Das Absorptionsspektrum der gereinigten Proteinlösung des Proteins FnrD63A besaß bei 420 nm eine für ein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum charakteristische Schulter (Abb. 18), der Quotient  $A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  war im Vergleich zum Wildtypprotein herabgesetzt. Die Proteinlösung des Proteins FnrD141A zeigte bei 420 nm nur eine schwache Absorption im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 18).



**Abb. 18: UV/VIS-Absorptionsspektren von gereinigten Wildtyp- und Fnr-Proteinen mit mutiertem Aspartatrest.** Dargestellt ist das Wildtypprotein (schwarzer Graph), die Proteinmutante FnrD63A (roter Graph) und FnrD141A (blauer Graph)

Ein weiteres Kriterium für die Art des Eisen-Schwefel-Zentrums ist die Menge an eingebautem Eisen. Die Bestimmung des Eisengehalts nach Lovenberg (Lovenberg *et al.*, 1963) wurde in vorangegangenen Arbeiten als erfolgreiche Methode zur Charakterisierung eines Eisen-Schwefel-Zentrums, insbesondere des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums des *B. subtilis* Fnrs, herangezogen (Reents *et al.*, 2006a).

Das Fnr aus *B. subtilis* liegt als Homodimer vor, wobei jedes Monomer im aktiven Zustand ein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum und damit 4 Mol Eisen pro Mol Monomer besitzt. Der Eisengehalt des Wildtypproteins betrug 3,6 Mol Eisen pro Mol Monomer, dies bestätigte den Einbau des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums. Im Vergleich dazu betrug der Eisengehalt der Mutantenproteine C227S, C230S und C235S, die kein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum mehr koordinieren, ca. 1 Mol Eisen pro Mol Fnr (Reents *et al.*, 2006a). Der Eisengehalt des Proteins FnrD63A von 2,5 Mol Eisen pro Mol Monomer deutete aber auf die Präsenz eines  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums hin (Tabelle 7). Der Eisengehalt der Mutante D141A betrug 1,8 Mol Eisen pro Mol Monomer und der Quotient  $A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  war im Vergleich zum Wildtypprotein um 66 % reduziert. Dies ist vergleichbar mit den Daten der Proteinmutanten ohne  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum (Reents *et al.*, 2006a).

**Tabelle 7:** Vergleich des gereinigten Fnr-Wildtyps mit den Aspartat-Mutantenproteinen

| Proteinbezeichnung | mutierte Aminosäure | Eisengehalt* <sup>1</sup><br>Mol Eisen : Mol Fnr | Absorption* <sup>2</sup><br>A <sub>420</sub> /A <sub>280</sub> |
|--------------------|---------------------|--|--|
| Wt                 | -                   | 3,6:1  | 0,42   |
| D63A               | Asp63Ala            | 2,5:1  | 0,24   |
| D141A              | Asp141Ala           | 1,8:1  | 0,14   |

\*<sup>1</sup> bestimmt nach Lovenberg

\*<sup>2</sup> Die *fnr*-Expression und die Messung des UV/VIS-Spektrum wurde in allen Experimenten unter Ausschluss von Sauerstoff durchgeführt.

Die Mutante D63A zeigt im Absorptionsspektrum eine charakteristische, leicht reduzierte Schulter bei 420 nm. Dies bedeutet, dass dieser Aminosäurerest nicht an der Koordination des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums beteiligt ist. Das Mutantenprotein D141A hingegen zeigte im Absorptionsspektrum bei 420 nm (Abb. 18) eine stark reduzierte Absorption. Dieses Spektrum ist vergleichbar mit dem der Fnr-Cysteinmutanten C227S, C230S und C235S. Die Eisenbestimmung ergab hier nur 1,8 Mol Eisen pro Mol Monomer, was auf den vierten Liganden des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums schließen lassen könnte. Zur weiteren Charakterisierung der Mutantenproteine *in vitro* wurden DNaseI Footprint Analysen durchgeführt.

#### 4.1.3 DNA-Bindungsstudien mit Fnr Proteinen

Es wurde bereits gezeigt, dass die Bindung von Fnr an die DNA abhängig von der Koordination eines intakten  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums ist (Reents *et al.*, 2006a). Mit Hilfe von DNaseI Footprint Analysen wurde die DNA-Bindung der Fnr Mutantenproteine FnrD141A und FnrD63A untersucht.

Mittels PCR wurde ein 310 bp langes *narG*-Promotorfragment (-200 bis +110 relativ zum Transkriptionsstartpunkt) durch einen 5'-Digoxigenin modifizierten Primer EH176Dig und einen nicht markierten Primer EH177 amplifiziert. 35 ng des gereinigten Fragments wurden unter anaeroben Bedingungen mit 1,6  $\mu\text{M}$  anaerob gereinigtem FnrCCC bzw. Fnr-Mutantenproteinen inkubiert und anschließend mit DNaseI behandelt. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente in einem 6%igen denaturierenden Polyacrylamidgel mit 7 M Harnstoff wurde die DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert.

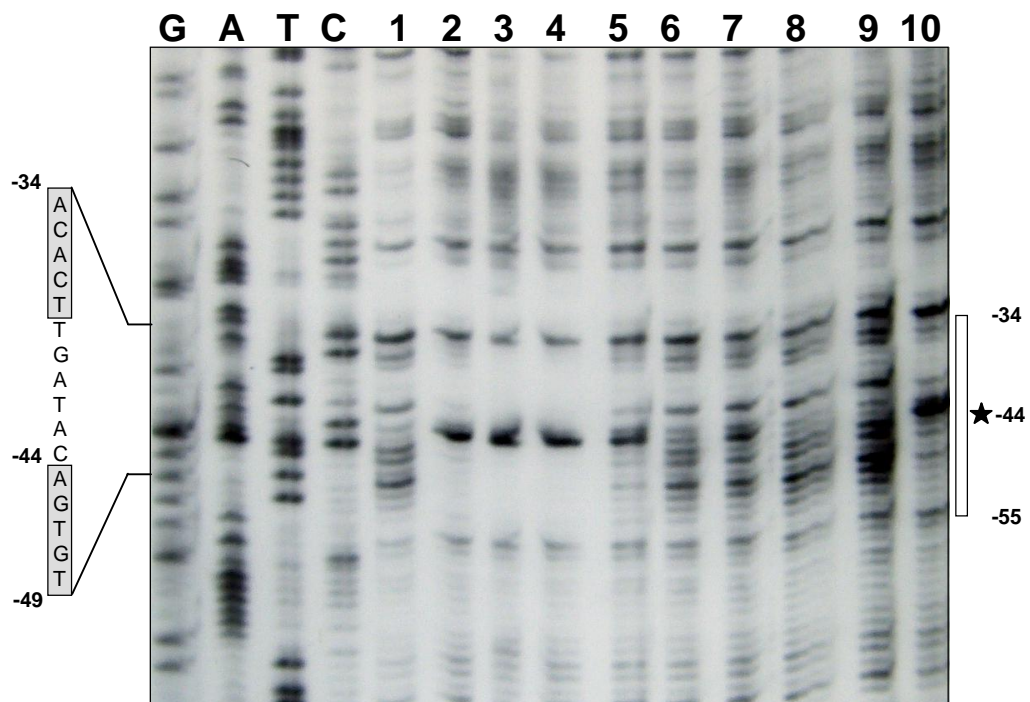
Die DIG-markierten DNA-Fragmente wurden mit einem spezifischen Anti-Digoxigenin Antikörper detektiert, der an eine alkalische Phosphatase gekoppelt

war. Das anschließend hinzugefügte Chemilumineszenzsubstrat CDP-Star wird durch die alkalische Phosphatase dephosphoryliert. Ergebnis dieser Dephosphorylierung ist ein angeregtes Molekül, das Energie in Form von Licht beim Übergang in den Grundzustand emittiert. Diese emittierte Energie kann durch Auflegen eines Röntgenfilm visualisiert werden (Abb. 19). Der Bereich auf der DNA, an den das Fnr-Protein gebunden hatte, wurde vor dem DNaseI Verdau geschützt. Dies ist auf dem Röntgenfilm als ein Bereich ohne sichtbares Bandenmuster, einem sogenannten „Footprint“, zu sehen. Zur genauen Ermittlung der Position wurden parallel auf dem Gel Sequenzierungsansätze mit denselben DIG-markierten Primern aufgetragen.

Wird das FnrCCC in der Footprint Analyse eingesetzt, ist im Bereich der Fnr-Bindestelle des *narG*-DNA-Fragments ein geschützter Bereich zu erkennen (Abb. 19, Spur 2). Im Vergleich zum Fragmentmuster ohne Proteinzugabe (Abb. 19, Spur 1) fehlen im Bereich zwischen -34 bis -55 diese Fragmente. Besonders auffällig ist jedoch eine verstärkte Bande bei Position -44 relativ zum Transkriptionsstartpunkt von *narG*. Solche DNaseI hypersensitiven Stellen treten auf, wenn die DNA durch Bindung der Proteine gebogen wird und dadurch besonders leicht DNaseI zugänglich ist.

Zur Überprüfung des DNA-Bindeverhaltens wurden das Fnr Protein D63A und D141A eingesetzt (Abb. 19, Spur 3, 8).





**Abb. 19: DNaseI Footprint Analysen.** Hierfür wurden verschiedene anaerob aufgereinigte *B. subtilis* Fnr-Proteine in einer Konzentration von 1,6  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Ein DNA-Fragment wurde eingesetzt, welches die Promotorregion mit Fnr-Bindestelle des *narG176* kodierenden Strang repräsentierte. (1) ohne Protein, (2) FnrCCC, (3) FnrD63A, (4) FnrG64A, (5) FnrS153A, (6) FnrL155A, (7) FnrR157A, (8) FnrD141A, (9) FnrR189V und (10) FnrE190A. Der Footprint ist durch einen weißen Balken markiert, die hypersensitive Stelle mit einem Stern. Die Bindestelle ist mit der Sequenz hervorgehoben.

Für das FnrD63A konnte ein vor DNaseI geschützter Bereich, vergleichbar mit dem FnrCCC, detektiert werden (Abb. 19, Spur 2, 3). Dementsprechend ist das Protein FnrD63A in der Lage, die DNA spezifisch zu binden. Für das FnrD141A konnte kein vor DNaseI geschützter Bereich detektiert werden (Abb. 19, Spur 8). Diese Mutante ist demzufolge nicht mehr fähig an die DNA zu binden.

#### 4.1.4 Das Mutantenprotein FnrD141C komplementiert das inaktivierte chromosomale *fnr*-Gen

Das in der Natur am häufigsten vorkommende Motiv der Koordination eines  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums ist das über vier Cysteinreste (Frazzon and Dean, 2003). Um die Rolle des Aspartatrests 141 des FnrS aus *B. subtilis* in der Koordination des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums weitergehend zu untersuchen, wurde dieses gegen einen Cysteinrest ausgetauscht. Sofern der Aspartatrest 141 der vierte Ligand des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums ist und der neu eingebrachte Cysteinrest die Koordination komplementieren kann, könnte durch diese Mutation die

Koordination eines neuartigen  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums über vier Cysteinreste erreicht werden.

Die Aktivität des FnrD141C Mutantenproteins wurde durch Komplementation *in vivo* über die Aktivität der *narG-lacZ* Reportergenfusion im *B. subtilis* Stamm HRB3 untersucht (Tabelle 8).

**Tabelle 8:**  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessung von *B. subtilis* Fnr, sowie FnrD141C

| Stamm                 | Relevanter Genotyp                               | β-Galaktosidase-Aktivität* <sup>1</sup> |      |
|-----------------------|--|---|------|
|                       |  | (Miller Units)                          | [%]  |
| <i>narG-lacZ</i>      |  |   |      |
| HRB3 <i>fnr</i>       | <i>fnr::spc amyE::P<sub>xyIA</sub>-fnr</i>       | 291                                     | 100  |
| HRB3 <i>fnr</i> D141C | <i>fnr::spc amyE::P<sub>xyIA</sub>-fnr</i> D141C | 45                                      | 15,5 |

\*<sup>1</sup> Die *fnr*-Expression wurde in allen anaerob durchgeführten Experimenten mit 2 % Xylose in SMM-Medium induziert. Zusätzlich enthielt das Medium 10 mM Nitrat. Die dargestellten Ergebnisse der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessung sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Die Standardabweichung betrug höchstens 15 %.

Während das inaktive FnrD141A Mutantenprotein nicht mehr in der Lage war die *narG-lacZ* Reportergenfusion zu aktivieren, konnte nach einer Komplementation mit dem FnrD141C Mutantenprotein eine Aktivität von 45 Miller Units erreicht werden. Das entspricht zu 15,5 % der Fnr Wildtypaktivität. Durch die Mutation zu einem Cysteinrest konnte die Fnr-Aktivität im FnrD141C Mutantenprotein somit teilweise wieder hergestellt werden.

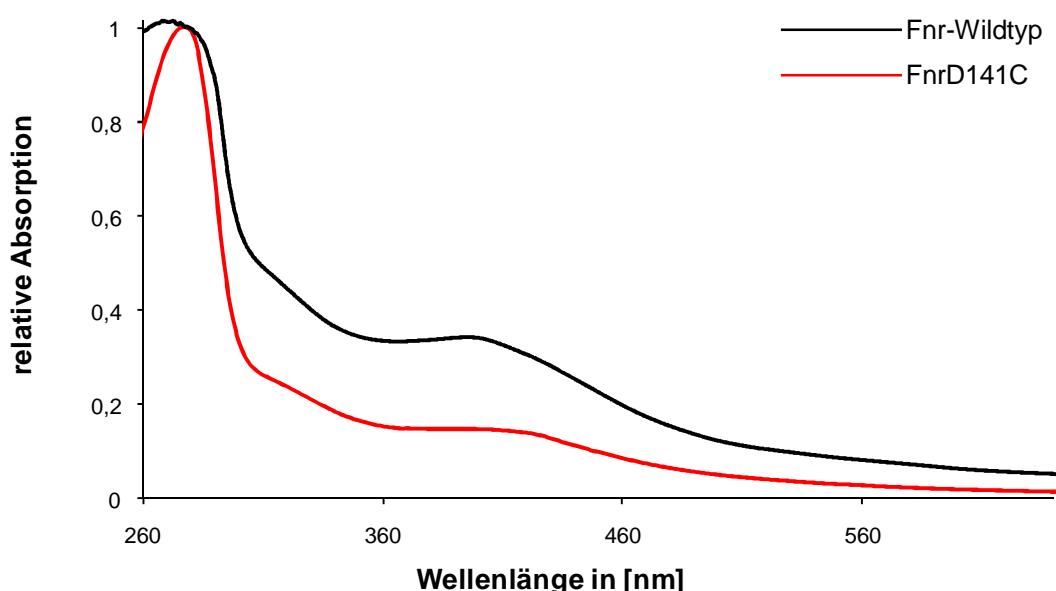
#### 4.1.5 Koordination eines $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums durch die Fnr-Mutante D141C

Um die Anwesenheit eines intakten  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums in dem FnrD141C Mutantenprotein zu überprüfen, wurde das Protein in *E. coli* heterolog produziert und anaerob gereinigt.

Das erhaltene Protein wurde anaerob spektroskopisch untersucht.

Das UV/VIS-Absorptionsspektrum des gereinigten *B. subtilis* FnrD141C-Proteins wies eine Schulter bei 420 nm auf (Abb. 20). Allerdings war der Quotient  $A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  im Vergleich zum Wildtypprotein um 66 % reduziert, was einem Wert von 0,14 entsprach (Tabelle 9). Dieser reduzierte Wert ist mit dem

Quotienten der Fnr-Proteine mit mutierten Cysteinresten (C227S, C230S und C235S), die kein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum mehr koordinieren können, vergleichbar (Reents *et al.*, 2006a)



**Abb. 20:** UV/VIS-Absorptionsspektren von gereinigten Wildtyp- und Fnr-Mutantenproteinen D141C mit mutiertem Aspartatrest. Dargestellt ist das Wildtypprotein (schwarzer Graph) und die Proteinmutante D141C (roter Graph)

Die Bestimmung des Eisengehalts ergab einen Wert von 2,6 Mol Eisen pro Mol Fnr Monomer (Tabelle 9). Für die Fnr-Cysteinmutanten ist ein Eisengehalt von 1 Mol pro Fnr Monomer beschrieben worden (Reents *et al.*, 2006a). Dieses Ergebnis widerspricht dem Ergebnis der UV/VIS-Spektroskopie und weist auf die Anwesenheit eines  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums hin.

**Tabelle 9:** Vergleich des gereinigten Wildtyp-Fnrs mit dem Mutantenprotein FnrD141C

| Proteinbezeichnung | mutierte Aminosäure | Eisengehalt* <sup>1</sup><br>Mol Eisen : Mol Fnr | Absorption* <sup>2</sup><br>$A_{420}/A_{280}$ |
|--------------------|---------------------|--|---|
| Wt                 | -                   | 3,6:1  | 0,42  |
| D141C              | Asp141Cys           | 2,6:1  | 0,14  |

\*<sup>1</sup> bestimmt nach Lovenberg

\*<sup>2</sup> Die *fnr*-Expression und die Messung des UV/VIS-Spektrums wurde in allen Experimenten unter Ausschluss von Sauerstoff durchgeführt.

Trotzdem lassen die Ergebnisse nicht eindeutig auf die Existenz eines  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums schließen.

#### 4.1.6 Die Fnr-Mutante D141C koordiniert ein neuartiges $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum

Um einen weiteren Hinweis darauf zu bekommen, ob der Aspartatrest 141 des FnrS aus *B. subtilis* eine Rolle in der Koordination des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums spielt, wurde eine Mößbauerspektroskopie durchgeführt. Während das Mößbauerspektrum der FnrCCC Mutante zwei Subspektren zeigte, die eine Koordination des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums über drei Cysteinreste und einen nicht-Cysteinrest nahe legt (Abb. 15), könnte das FnrD141C das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum über vier Cysteinreste koordinieren. Ein durch vier Cysteinreste koordiniertes  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum kann durch Mößbauerspektroskopie identifiziert werden.

Für die Mößbauerspektroskopie wurden *E. coli* Zellen, die das Fnr-Mutantenprotein FnrD141C heterolog überproduzieren, in eisenarmem SMM-Minimalmedium kultiviert. Als Eisenquelle wurde wiederum  $34\text{ }\mu\text{M}$   $^{57}\text{FeCl}_3$  zugegeben, die Reinigung erfolgte wie zuvor beschrieben. Das Protein wurde auf  $1\text{ mM}$  konzentriert und in flüssigem Stickstoff gefroren.

Das Mößbauerspektren wurde erneut in Kooperation mit Prof. Trautwein von der Universität Lübeck aufgenommen. Das Spektrum zeigte keine Hinweise auf ein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum. Es konnten als Hauptbestandteile nur Fe(III) Komponenten gemessen werden. Keiner der gemessenen Parameter wies auf ein Eisen-Schwefel-Zentrum hin (Daten nicht gezeigt).

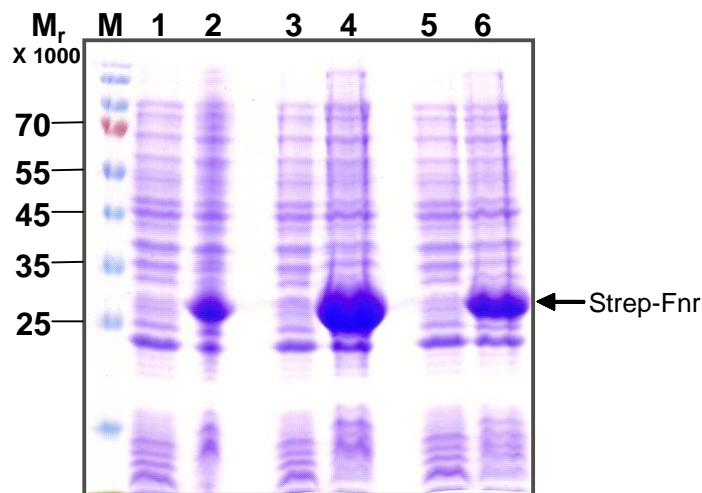
In der UV/VIS-Spektroskopie konnte lediglich eine schwache Absorption bei  $420\text{ nm}$  detektiert werden (Abb. 20). Parallel dazu wurde ein hoher Eisengehalt in der Probe gemessen. Es ist denkbar, dass der neuartig koordinierte Cluster, der FnrD141C Mutante instabil ist und während Reinigung und Konzentrierung des Proteins degradiert.

Für das Fnr aus *E. coli* konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der Mößbauerspektroskopie von ganzen Zellen möglich war, den Kofaktor des Regulators *in vivo* zu untersuchen (Popescu *et al.*, 1998). Daher wurden die *B. subtilis* mutierten Fnr-Proteine D141A und D141C, im Vergleich zum Fnr Wildtyp in *E. coli* produziert und Mößbauerspektren der Gesamtzelle aufgenommen werden.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte erneut in eisenarmem SMM-Medium mit  $34\text{ }\mu\text{M}$   $^{57}\text{FeCl}_3$  als Eisenquelle. Nach 16 Stunden Proteinproduktion unter

aeroben Bedingungen und nachfolgend drei Stunden Kultivierung unter anaeroben Bedingungen wurden die Zellen sedimentiert und mit glycerinhaltigem Puffer gewaschen.

Der Erfolg der Proteinüberproduktion wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 21). Jeweils 800 mg der gewaschenen Zellpellets wurden in einem Mößbauergefäß mit flüssigem Stickstoff gefroren. Die Proben wurden anschließend bei 77 K analysiert.



**Abb. 21: Rekombinante Darstellung des FnrWT Proteins, sowie der Mutantenproteine FnrD141A und FnrD141C für Mößbauerspektroskopie mit Gesamtzellextrakt.** Gezeigt wird das Proteingemisch des Zellextraktes aus *E. coli* BL21C+-Zellen vor Induktion und nach 16 h Proteinproduktion des FnrWT, FnrD141A, D141C. (Spur 1) Zellextrakt aus BL21C+-Zellen, die den Vektor zur heterologen Überproduktion des FnrD141C-Proteins tragen, vor Induktion mit Anhydrotetracyclin und (Spur 2) nach 16 h Proteinproduktion FnrD141C. (Spur 3) Zellextrakt aus BL21C+-Zellen, die den Vektor zur heterologen Überproduktion des FnrD141A-Proteins tragen, vor Induktion mit Anhydrotetracyclin und (Spur 4) nach 16 h Proteinproduktion. (Spur 5) Zellextrakt aus BL21C+-Zellen, die den Vektor zur heterologen Überproduktion des Fnr-Wildtyp-Proteins tragen, vor Induktion mit Anhydrotetracyclin und (Spur 6) nach 16 h Proteinproduktion Fnr-Wildtyp. Spur M zeigt die Trennung von Markerproteinen (Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Die relative molekulare Masse ist angegeben. Der Zellextrakt wurden nach Zugabe von SDS-PAGE-Probenpuffer 15 Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend durch ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel getrennt. Die Proteine wurden durch Coomassie Brilliant Blau-Färbung visualisiert.

Das erhaltene Mößbauerspektrum für den Fnr-Wildtyp (Abb. 22 A) spaltete sich in zwei Quadrupol-Dubletts, die 32 % des Signals repräsentierten. Das Flächenverhältnis zwischen Subspektrum (1) und (2) betrug 3:1. Die Parameter für die Isomerieverschiebung sind  $\delta_1 = 0,45$  mm/s und für die Quadrupolaufspaltung  $\Delta E_{Q1} = 0,96$  mm/s,  $\delta_2 = 0,47$  mm/s und  $\Delta E_{Q2} = 1,79$  mm/s.

Diese Parameter sind charakteristisch für ein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum, welches über nur 3 Cysteinreste koordiniert wird (Layer *et al.*, 2005; Marinoni *et al.*, 2008; Ollagnier-de Choudens *et al.*, 2005). Für den Fnr-Wildtyp findet man dementsprechend die gleiche Koordination des Clusters wie schon für das Mutantenprotein FnrCCC beschrieben. Das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum ist auch hier über drei Cystein- und einen nicht-Cystein-Liganden koordiniert.

Durch dieses Motiv entsteht eine zusätzliche Schulter bei 1,3 mm/s (Abb. 22 A). Die unterschiedlichen  $\delta$  und  $\Delta E_Q$ -Werte für die Subspektren (1) und (2) deuten auf die unterschiedliche Koordination des Eisens, sowohl Cystein-koordiniert als auch nicht Cystein-koordiniert, hin. Die Isomerieverschiebung der nicht-Cystein-koordinierten Komponente ist 0,1 mm/s höher als die der Cystein-koordinierten Komponente. Dies deutet auf eine schwächere kovalente Bindung des Eisens hin, wie es für Sauerstoff oder Stickstoff im Gegensatz zu Schwefel beschrieben worden ist (Schünemann and Winkler, 2000b).

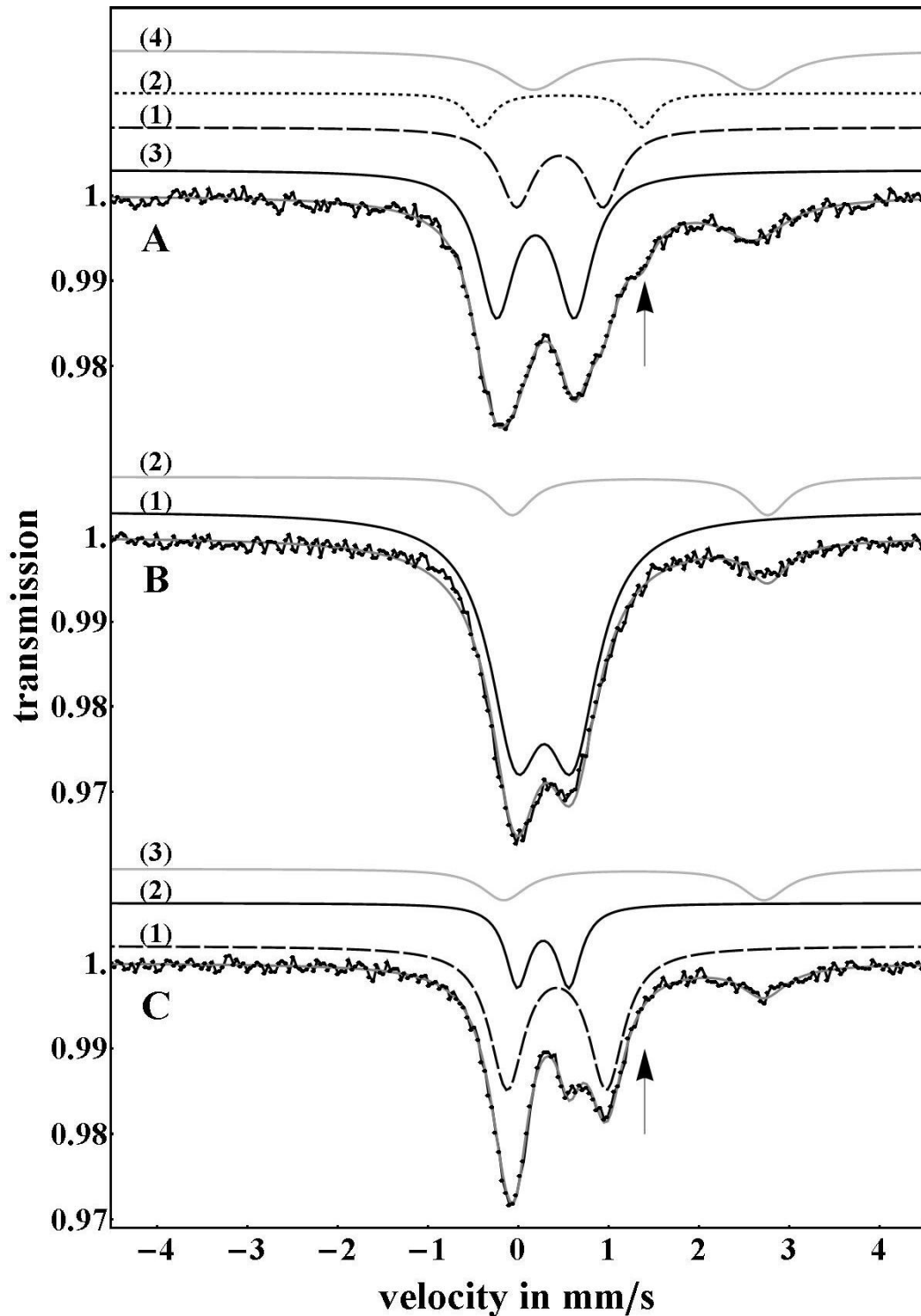
Das Subspektrum 3 mit 45 % des Signals und den Parametern  $\delta_3 = 0,19$  mm/s und  $\Delta E_{Q3} = 0,86$  mm/s ist charakteristisch für einen high spin Eisen(III)-Komplex, der tetraedrisch Schwefel koordiniert, charakteristisch für ein  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Zentrum (Abb. 22 A, Subspektrum 3) (Marinoni *et al.*, 2008; Ollagnier-de Choudens *et al.*, 2005; Tse Sum Bui *et al.*, 2003).

Das Subspektrum 4 mit 23 % des Signals und den Parametern  $\delta_4 = 1,38$  mm/s und  $\Delta E_{Q4} = 2,43$  mm/s zeigt  $\text{Fe}^{2+}$ -Metabolite in der Probe, die durch die Kultivierung der *E. coli* Zellen mit Eisen Citrat natürlicherweise entstehen (Abb. 22 A, Subspektrum 4) (Matzanke *et al.*, 1989).

Das Mößbauerspektrum für die Fnr-Mutante FnrD141A zeigte keine Signatur eines  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums. Das Spektrum teilt sich in zwei Subspektren. Subspektrum (1) repräsentiert 88 % des Signals mit den Parametern  $\delta_1 = 0,29$  mm/s und  $\Delta E_{Q1} = 0,63$  mm/s (Abb. 22 B, Subspektrum 1). Diese Parameter sind charakteristisch für high spin  $\text{Fe}^{3+}$ -Komplexe, die durch Bindung des Eisens an die freien Cysteine im Protein vorkommen. Das Subspektrum (2) repräsentiert 12 % des Signals mit den Parametern  $\delta_2 = 1,35$  mm/s und  $\Delta E_{Q2} = 2,83$  mm/s (Abb. 22 B, Subspektrum 2), dies entspricht dem zuvor beschriebenen freien Eisen.

Im Vergleich dazu zeigt das Mößbauerspektrum der Fnr-Mutante FnrD141C ein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum, welches über 4 Cysteine koordiniert wird

(Abb. 22C, Subspektrum 1). Das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum dieser Mutante wird nur durch einen einzigen Satz Parameter mit den Werten  $\delta_1 = 0,42 \text{ mm/s}$  und  $\Delta E_{Q1} = 1,10 \text{ mm/s}$  und einer Signalstärke von 60 % des gesamten Eisens repräsentiert. Auch die zusätzliche Schulter wie sie bei einem Cluster mit einem Koordinationsverhältnis von 3:1 vorgefunden wird, fehlt hier (Abb. 22 C, markiert durch einen Pfeil). Ferner wurde in diesem Spektrum  $\text{Fe}^{3+}$  und  $\text{Fe}^{2+}$  (Abb. 22 C, Subspektrum 2 und 3) mit den Parametern,  $\delta_2 = 0,27 \text{ mm/s}$  und  $\Delta E_{Q2} = 0,57 \text{ mm/s}$ ,  $\delta_3 = 1,28 \text{ mm/s}$  und  $\Delta E_{Q3} = 2.88 \text{ mm/s}$ , mit Signalstärken von 23 bzw. 17 % detektiert.



**Abb. 22: Mößbauerspektroskopie von ganzen Zellen mit überproduziertem FnrWt, FnrD141A bzw. FnrD141C Protein bei 77 K.** Das Mößbauerspektrum wurde bei einer Temperatur von 77 K gemessen. Die Daten wurden durch Annäherung an eine Lorentzverteilung analysiert. (A) zeigt das Spektrum des Fnr Wildtypproteins mit 4 Subspektren. Subspektrum (1) und (2) entsprechen dem über Cystein und nicht-Cystein koordinierten Eisen. Subspektrum (3) entspricht tetradrisch koordiniertem  $\text{Fe}^{3+}$ . Subspektrum (4) zeigt freies  $\text{Fe}^{2+}$ . (B) zeigt das Spektrum des FnrD141A mit 2 Subspektren. Subspektrum (1) zeigt  $\text{Fe}^{3+}$  gebunden an freies Cystein, Subspektrum (2) zeigt freies  $\text{Fe}^{2+}$ . (C) zeigt das Spektrum des FnrD141C mit 3 Subspektren, Subspektrum (1) zeigt über Cystein koordiniertes Eisen in einem  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum, Subspektrum (2) zeigt an freie Cysteine gebundenes  $\text{Fe}^{3+}$ , Subspektrum (3) zeigt freies  $\text{Fe}^{2+}$ .



Zusammengefasst zeigen die Mößbauerspektren mit ganzen Zellen für den Fnr Wildtyp das Vorhandensein eines  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum, das über drei Cysteinreste und einen nicht-Cysteinrest koordiniert wird (Abb. 22 A, Subspektrum 1 und 2), wie es zuvor schon für das FnrCCC aus *B. subtilis* beschrieben wurde. Es konnte erstmals das Vorhandensein eines  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Zentrums gezeigt werden (Abb. 22 A, Subspektrum 3). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Inaktivierung des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums durch Sauerstoff über ein  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Zentrum erfolgt, wie es für das Fnr aus *E. coli* gezeigt worden ist. Der Übergang vom  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum zum  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Zentrum verursacht eine Konformationsänderung im Fnr aus *E. coli*, was zur Monomerisierung führt. Das Protein kann nicht mehr an die DNA binden und mit der RNA Polymerase interagieren (Crack *et al.*, 2004; Khoroshilova *et al.*, 1995; Lazazzera *et al.*, 1996; Popescu *et al.*, 1998; Sutton *et al.*, 2004).

Durch den Aminosäureaustausch des Aspartatrests an der Position 141 durch einen Alaninrest im Fnr aus *B. subtilis* kann kein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum mehr koordiniert werden. Die Bindung an die DNA findet nicht mehr statt, daraus resultiert ein Aktivitätsverlust des Proteins.

Der Aminosäureaustausch des Aspartatrestes 141 gegen einen Cysteinrest bedingt eine reduzierte Aktivität des Fnr *in vivo*. Das Mutantenprotein FnrD141C koordiniert ein labiles  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum über vier Cysteinreste (Cys141, Cys227, Cys230 und Cys235), dies wurde durch Mößbauerspektroskopie bestätigt. Damit konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Aspartatrest 141 um den vierten Liganden des Eisen-Schwefel-Zentrums handelt, welcher mit den C-terminal konservierten Cysteinresten (227, 230, 235) das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum im Fnr Protein aus *B. subtilis* koordiniert.

#### 4.1.7 Die Bindung des *Bacillus subtilis* Fnr an DNA

Die Regulatoren der Crp/Fnr-Familie binden die DNA über das Helix-Turn-Helix-Bindemotiv, welches in der C-terminalen Domäne der Transkriptionsfaktoren lokalisiert ist.

Die identifizierte Fnr Bindesequenz aus *B. subtilis* 5'-TGTGA-N<sub>6</sub>-TCACA-3' ist nahezu identisch mit der des Crp aus *E. coli* (Ebright *et al.*, 1989; Ebright,

$\alpha_E$   $\alpha_F$   
*B. subtilis* Fnr 173 IVLTNQDLAKFCAAAR<sup>ESV</sup>NRMLGDLRKKG 203  
*E. coli* Crp 165 IKITRQEIGQIVGCS<sup>RET</sup>VGRI<sup>L</sup>KMLE<sup>D</sup>QN 195  
 \* . \* : : : : . . . \* \* \* \* \* : \* : : :

Um die Rolle der Aminosäurereste Arg189 und Glu190 für die Bindung des Transkriptionsfaktors Fnr aus *B. subtilis* an die DNA zu untersuchen, wurden diese gegen einen Valin- bzw. Alaninrest ausgetauscht.

105

**Tabelle 10:**  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessung von *B. subtilis* Fnr, sowie Fnr R189V und FnrE190A

| Stamm                 | Relevanter Genotyp                               | β-Galaktosidase-Aktivität* <sup>1</sup> |     |
|-----------------------|--|---|-----|
|                       |  | (Miller Units)                          | [%] |
| <i>narG-lacZ</i>      |  |   |     |
| HRB3 <i>fnr</i>       | <i>fnr::spc amyE::P<sub>xyIA</sub>-fnr</i>       | 291                                     | 100 |
| HRB3 <i>fnr</i> R189V | <i>fnr::spc amyE::P<sub>xyIA</sub>-fnr</i> R189V | <2                                      | <2  |
| HRB3 <i>fnr</i> E190A | <i>fnr::spc amyE::P<sub>xyIA</sub>-fnr</i> E190A | 5,8                                     | <2  |

\*<sup>1</sup> Die *fnr*-Expression wurde in allen anaerob durchgeführten Experimenten mit 2 % Xylose in SMM-Medium induziert. Zusätzlich enthielt das Medium 10 mM Nitrat. Die dargestellten Ergebnisse der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessung sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Die Standardabweichung betrug höchstens 15 %.

Die Aktivität beider Fnr-Mutanten lag mit <2 und 5,8 Miller Units unter 2 % im Vergleich zur Aktivität des Wildtyps mit 291 Miller Units (Tabelle 10). Die Proteinmutanten waren folglich *in vivo* nicht aktiv.

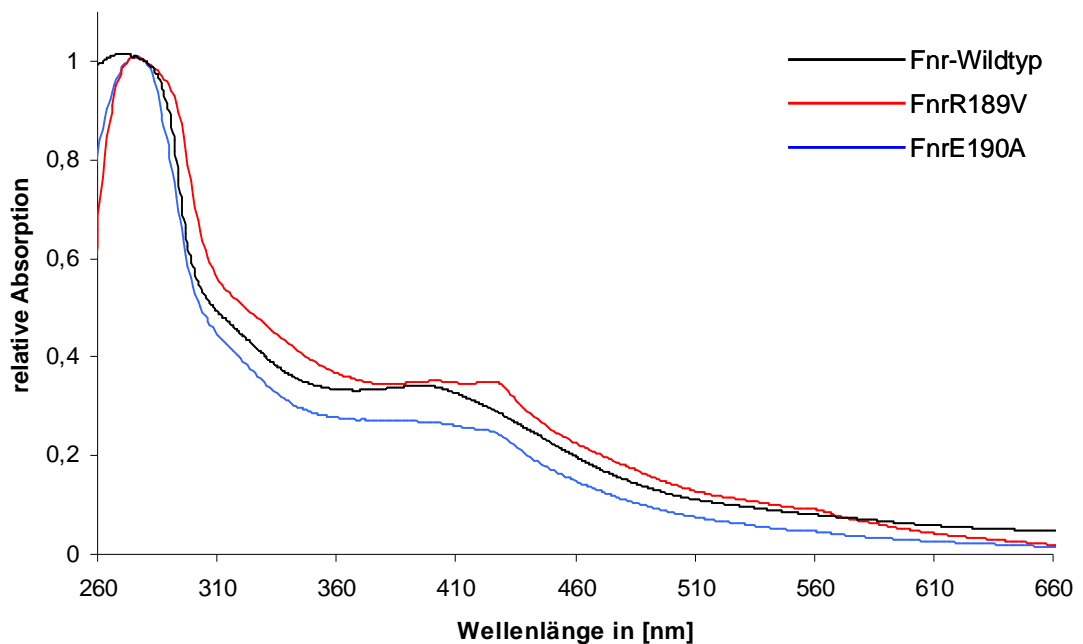
Um zu untersuchen wie dieser Aktivitätsverlust zu begründen ist, wurden die Fnr-Mutanten FnrR189V und FnrE190A rekombinant als Fusionsprotein mit Strep-Tag produziert und unter anaeroben Bedingungen gereinigt.

Mit diesen gereinigten Proteinen wurden DNaseI Footprint Analysen durchgeführt, um die Bindung an die DNA zu untersuchen (Abb. 19, Spur 9 und 10). Spur 9 und 10 (Abb. 19) zeigen die Footprintanalyse des FnrR189V und FnrE190A. In der Analyse des FnrR189V (Abb. 19, Spur 9) konnten weder ein vor DNaseI geschützter Bereich noch eine hypersensitive Stelle detektiert werden. Ähnliches zeigte sich für das FnrE190A (Abb. 19, Spur 10). Auch hier existierte kein vor DNaseI geschützter Bereich. Dennoch konnte eine hypersensitive Stelle an Position -44 relativ zum Transkriptionsstartpunkt detektiert werden.

Durch Footprintanalysen konnte gezeigt werden, dass das Mutantenprotein FnrR189V nicht in der Lage ist, an die DNA zu binden (Abb. 19, Spur 9). Durch die fehlende DNA-Bindung ist die Transaktivierung nicht möglich, dies wird deutlich durch den Verlust der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im *in vivo* Komplementationssystem (Tabelle 10). Das Mutantenprotein FnrE190A zeigt in der DNaseI Footprint Analyse eine schwache Bindung an die DNA, sichtbar durch die Ausbildung der hypersensitiven Stelle (Abb. 19, Spur 10). Durch diese

schwache Bindung war eine Transaktivierung möglich, die gemessen an der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Reportergenfusion mit 5,8 Miller Units jedoch nicht sehr effizient war (Tabelle 10).

Um zu untersuchen, warum diese Mutantenproteine nicht mehr in der Lage sind an die DNA zu binden, wurde die Fähigkeit zur Koordination des Kofaktors, dem  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum, durch UV/VIS-Spektroskopie untersucht.



**Abb. 24: UV/VIS-Absorptionsspektren von gereinigtem Wildtyp- und Fnr-Mutantenproteinen R189V und E190A.** Dargestellt ist das Wildtypprotein (schwarzer Graph), die Proteinmutante R189V (roter Graph) und die Proteinmutante E190A (blauer Graph)

Das UV/VIS-Absorptionsspektrum der gereinigten *B. subtilis* Mutantenproteine FnrR189V und FnrE190A wiesen eine starke Absorption bei 420 nm auf (Abb. 24). Der Quotient  $A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  näherte sich für beide Mutantenproteine mit einem Wert von 0,35 bzw. 0,26 dem des Wildtypproteins mit einem Wert von 0,42 an (Tabelle 11) und war dadurch mit dem Fnr Wildtyp vergleichbar.

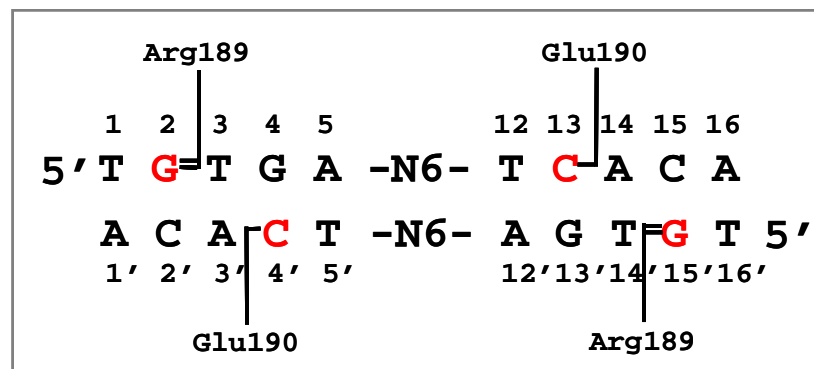
**Tabelle 11:** Vergleich des gereinigten Wildtyp-FnrS und der Mutantenproteine FnrR189V und FnrE190A

| Proteinbezeichnung | mutierte Aminosäure | Eisengehalt* <sup>1</sup><br>Mol Eisen : Mol Fnr | Absorption* <sup>2</sup><br>$A_{420}/A_{280}$ |
|--------------------|---------------------|--|---|
| Wt                 | -                   | 3,6:1  | 0,42  |
| R189V              | Arg189Val           | 2,1:1  | 0,35  |
| E190A              | Glu190Ala           | 3,6:1  | 0,26  |

\*<sup>1</sup> bestimmt nach Lovenberg\*<sup>2</sup> Die *fnr*-Expression und die Messung des UV/VIS-Spektrums wurde in allen Experimenten unter Ausschluss von Sauerstoff durchgeführt.

Die Mutantenproteine FnrR189V und FnrE190A zeigten ein vollständig rekonstituiertes  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum. Dementsprechend hat diese Mutation keinen Einfluss auf die Bindung des Kofaktors.

Für das Crp aus *E. coli* konnte gezeigt werden, dass durch den Austausch der Aminosäurereste Arg180 und Glu181 die Spezifität der DNA-Bindung verloren geht (Parkinson *et al.*, 1996). Im *B. subtilis* Fnr führt der Austausch der komplementären Aminosäurereste Arg189 und Glu190 zum Verlust der DNA-Bindung. Dieses deutet auf einen vergleichbaren Mechanismus der DNA-Bindung für Crp aus *E. coli* und Fnr aus *B. subtilis* hin, so dass folgendes hypothetisches Modell entwickelt werden kann (Abb. 25).



**Abb. 25: Modell der DNA-Bindung des FnrS aus *B. subtilis* nach Crp aus *E. coli*.** Gezeigt ist die DNA Bindesequenz des FnrS aus *B. subtilis*. Über die rot markierten Basen finden die spezifischen Wechselwirkungen der Aminosäurereste Arg189 und Glu190 durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken statt. Die Anzahl der Wasserstoffbrücken ist durch Striche gekennzeichnet.

Der Argininrest 189 des FnrS aus *B. subtilis* könnte über die Guanidingruppe der Seitenkette zwei Wasserstoffbrücken mit der Base G2 bzw. G15' ausbilden, während der Glutamatrest 190 über die Carboxylgruppe der Seitenkette eine Wasserstoffbrücke mit der Base C13 bzw. C4' ausbilden könnte. Durch diese

Wechselwirkungen könnte es zu einer spezifischen Bindung an die DNA kommen. Werden die Seitenketten der Aminosäuren deletiert und durch Methylgruppen ausgetauscht, können keine Wasserstoffbrücken über diese Aminosäurereste mit den entsprechenden Basen mehr ausgebildet werden und die Spezifität der Bindung und/oder die Bindung an die DNA geht verloren.

#### **4.1.8 Die konservierte Domäne des *Bacillus subtilis* Fnr**

Durch Aminosäuresequenzvergleiche des Fnr-Proteins verschiedener Bacilli ist ein hochkonservierter Bereich von 11 Aminosäuren (AS147-157) besonders auffällig (Abb. 16). Sekundärstrukturvorhersagen für das Fnr aus *B. subtilis*, zeigen in diesem Bereich eine  $\alpha$ D-Helix. Diese  $\alpha$ D-Helix findet sich bei weiteren Mitgliedern der Crp/Fnr-Familie, wie dem Crp und PrfA.

Im PrfA führt der Austausch des Aminosäurerests Gly145 mit einem Serin zu einem Signal unabhängigen, konstitutiv aktiven Protein. Die Mutation in der  $\alpha$ D-Helix bewirkt eine Stabilisierung des Helix-Turn-Helix-Motivs, also eine Stabilisierung der aktiven Konformation (Eiting *et al.*, 2005; Ripio *et al.*, 1997). Durch den komplementären Austausch des Gly149 zu einem Serin in der  $\alpha$ D-Helix des Fnr aus *B. subtilis* wird die DNA-Bindung inaktiviert (Reents *et al.*, 2006a).

Für das Crp aus *E. coli* konnten durch Mutationen in dieser Helix verschiedene Effekte beobachtet werden. Die Mutation des Aminosäurerests Asp138 zu Leucin, welche sich im aktiven Zustand des Proteins in der  $\alpha$ D-Helix befindet, stabilisiert den inaktiven Zustand des Proteins, wohingegen die Mutation des Aminosäurerests Alanin 144 zu Threonin in der  $\alpha$ D-Helix zu einem Kofaktor unabhängigen Phänotyp des Crps führt (Kim *et al.*, 1992; Sharma *et al.*, 2009). Im inaktiven Zustand des Crps bilden die  $\alpha$ D-Helices beider Monomere eine coiled-coil-Struktur aus, die das HTH-Motiv maskieren. Durch eingebrachte Mutationen wie der des Aminosäurerests Ala144 zu Threonin wird die Stabilität der coiled-coil-Struktur vermindert. Es findet eine Reorientierung im Protein statt, durch welche das HTH-Motiv nach außen exponiert wird. Die  $\alpha$ D-Helix ist somit eine so genannte ‚switch‘ Domäne, über die die Reorientierung des Proteins vom inaktiven zum aktiven Zustand organisiert wird (Sharma *et al.*, 2009).

Um die Rolle der  $\alpha$ D-Helix des FnrS aus *B. subtilis* für den Aktivierungsprozess zu untersuchen, wurden einzelne Aminosäurereste des hochkonservierten Bereichs durch gerichtete Mutagenese von Serin an der Position 153, von Leucin155 sowie von Arginin an der Position 157 des *B. subtilis* FnrS gegen einen Alaninrest ausgetauscht (Frädrich, 2007). Die Aktivität dieser Fnr Mutantenproteine wurde zunächst in dem etablierten Komplementationstest untersucht und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität gemessen (Tabelle 12).

**Tabelle 12:**  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessung von *B. subtilis* Fnr, sowie FnrS153A, FnrL155A und FnrR157A

| Stamm                 | Relevanter Genotyp                               | β-Galaktosidase-Aktivität* <sup>1</sup> |     |
|-----------------------|--|---|-----|
|                       |  | (Miller Units)                          | [%] |
| <i>narG-lacZ</i>      |  |   |     |
| HRB3 <i>fnr</i>       | <i>fnr::spc amyE::P<sub>xylA</sub>-fnr</i>       | 291                                     | 100 |
| HRB3 <i>fnr</i> S153A | <i>fnr::spc amyE::P<sub>xylA</sub>-fnr</i> S153A | 80                                      | 27  |
| HRB3 <i>fnr</i> L155A | <i>fnr::spc amyE::P<sub>xylA</sub>-fnr</i> L155A | <2                                      | <2  |
| HRB3 <i>fnr</i> R157A | <i>fnr::spc amyE::P<sub>xylA</sub>-fnr</i> R157A | <2                                      | <2  |

\*<sup>1</sup> Die *fnr*-Expression wurde in allen anaerob durchgeführten Experimenten mit 2 % Xylose in SMM-Medium induziert. Zusätzlich enthielt das Medium 10 mM Nitrat. Die dargestellten Ergebnisse der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessung sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Die Standardabweichung betrug höchstens 15 %.

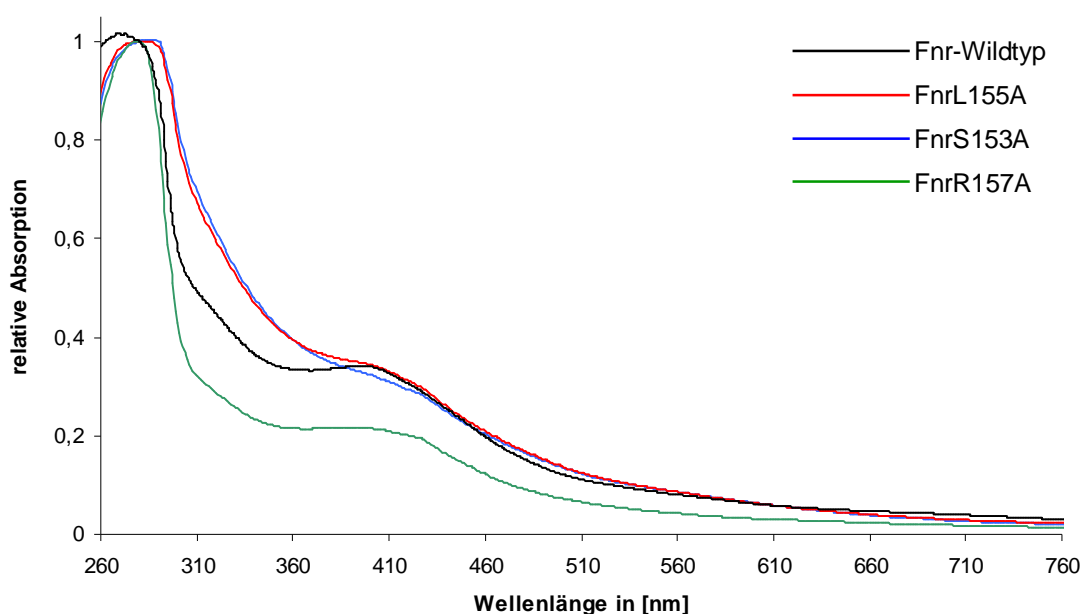
Der Aminosäureaustausch des Ser155 bzw. des Arg157 bewirkte eine Inaktivierung des Regulators *in vivo*. Die gemessene  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität lag unter 2 Miller Units im Vergleich zum Wildtypprotein, welches eine gemessene  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von 291 Miller Units aufweist. Die Mutation des Serinrests an Position 153 gegen einen Alaninrest im Fnr Protein bewirkte eine Reduktion der Aktivität auf 30 % *in vivo*.

Um die Frage zu beantworten, ob der Aktivitätsverlust der Mutantenproteine durch einen Verlust der Koordination des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums zustande kommt, wurden diese spektroskopisch untersucht.

Um die *in vitro* Untersuchung der Mutantenproteine FnrS153A, FnrL155A und FnrR157A zu ermöglichen, wurden diese heterolog produziert und anaerob chromatographisch gereinigt.

Untersuchungen durch UV/VIS-Spektroskopie zeigten durch die charakteristische Schulter bei 420 nm für die Mutantenproteine ein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum (Abb. 26). Während die Fnr Mutantenproteine FnrS153A und

FnrL155A eine mit dem Fnr Wildtyp vergleichbare Absorption bei 420 nm zeigten, war die gemessene Schulter des FnrR157A leicht reduziert.



**Abb. 26:** UV/VIS-Absorptionsspektren von gereinigtem Wildtyp- und Fnr-Mutantenproteinen S153A, L155A und R157A. Dargestellt ist das Wildtypprotein (schwarzer Graph), die Proteinmutante S153A (blauer Graph), die Proteinmutante L155A (roter Graph) und die Proteinmutante R157A (grüner Graph)

Auch die Bestimmung des Eisengehalts ließ auf den Einbau des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums schließen. Die Proteinmutanten Ser153A und L155A zeigten einen Eisengehalt vergleichbar dem des Wildtyps, während die Mutante FnrR157A einen reduzierten Eisengehalt zeigte (Tabelle 13).

**Tabelle 13:** Vergleich des gereinigten Wildtyp-Fnrs mit den Mutantenproteinen FnrS153A, FnrL155A und FnrR157A

| Proteinbezeichnung | mutierte Aminosäure | Eisengehalt* <sup>1</sup><br>Mol Eisen : Mol Fnr | Absorption* <sup>2</sup><br>$A_{420}/A_{280}$ |
|--------------------|---------------------|--|---|
| Wt                 | -                   | 3,6:1  | 0,42  |
| S153A              | Ser153Ala           | 2,6:1  | 0,35  |
| L155A              | Leu155Ala           | 3,1:1  | 0,36  |
| R157A              | Arg157Ala           | 1,5:1  | 0,21  |

\*<sup>1</sup> bestimmt nach Lovenberg

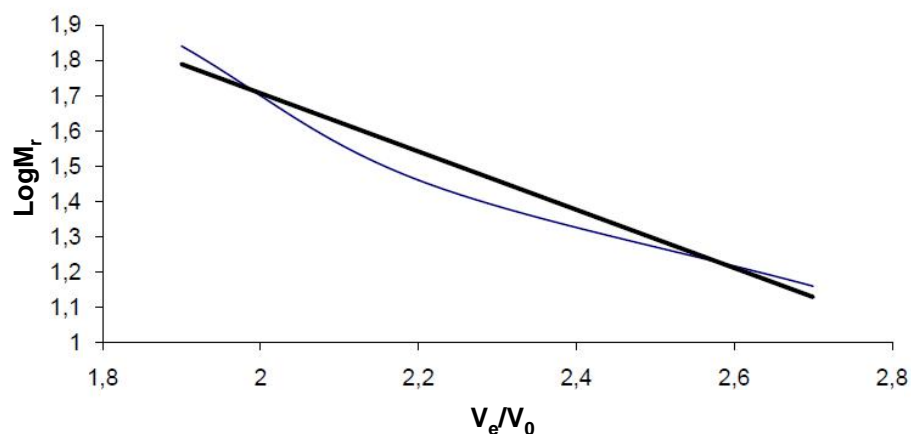
\*<sup>2</sup> Die *fnr*-Expression und die Messung des UV/VIS-Spektrum wurde in allen Experimenten unter Ausschluss von Sauerstoff durchgeführt



Da sich die  $\alpha$ D-Helix des Fnrs neben der potentiellen Dimerisierungshelix  $\alpha$ C befindet, sollte über Gelpermeationsexperimente (GPC) der Oligomerisierungsgrad überprüft werden. Mittels Gelpermeationschromatographie konnte bereits gezeigt werden, dass die Dimerisierung des Fnr Wildtypproteins sauerstoffunabhängig ist und sowohl aerob als auch anaerob stets als Dimer vorliegt (Reents *et al.*, 2006a).

Durch GPC kann die molekulare Masse nativer Proteine und Proteinkomplexe untersucht werden. Für die analytische GPC wurde hier eine Superdex 200 HR 10/30-Säule von Amersham Biosciences verwendet. Diese Säule trennt Proteine einer molekularen Masse von 10-600 kDa. Die verwendete Säule enthält poröse Kügelchen aus hochvernetzter Agarose mit kovalent gebundenem Dextran. Die porösen Kügelchen erzeugen einen Molekularsiebeffekt und können so Proteine nach ihrer Größe auftrennen. Kleine Moleküle können in die Kügelchen eindringen und haben dadurch eine längere Retentionszeit, große Moleküle hingegen verbleiben im wässrigen Medium und passieren die Säule schneller. Das Maß für die unterschiedlichen Größen der Proteine ist die Retentionszeit.

Um die exakte Größe des Proteins bestimmen zu können, wurde zuerst eine Eichung der Säule mit drei Proteinen BSA (66 kDa), Carboanhydrase (29 kDa) und Lysozym (14,7 kDa) vorgenommen.

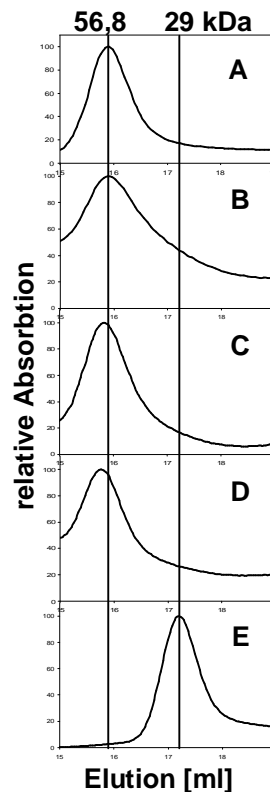


**Abb. 27: Eichreihe für die Gelpermeationschromatographie** Für die Eichreihe wurden folgende Eichproteine verwendet: BSA (66 kDa), Carboanhydrase (29 kDa) und Lysozym (14,7 kDa).

Der Quotient  $V_e/V_0$  ergibt sich aus dem Elutionsvolumen  $V_e$  [ml], das für jedes Protein spezifisch ist und  $V_0$  [ml] dem Elutionsvolumen von Dextran blue (2.000 kDa). Diese Verbindung besitzt ein hinreichend großes Molekulargewicht, so dass es ohne Verzögerung von der Säule eluiert.  $V_0$  stellt somit das Totvolumen der Säule dar. Für  $V_0$  wurden die Herstellerangaben von 7,7 ml eingesetzt. Der Quotient  $V_e/V_0$  jedes Eichproteins wird gegen den Logarithmus der spezifischen molekularen Masse aufgetragen. Über die Gleichung der Regressionsgerade (Abb. 27) ist es möglich, das Molekulargewicht unbekannter Proteine anhand des Elutionsvolumens zu errechnen. Um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten wurden alle Proteine dreimal gemessen.

$$\text{LogMr} = -0,824 \times (V_e/V_0) + 3,355$$

Nach der Eichung wurden jeweils 100 µl einer anaerob gereinigten 150 µM Fnr-Lösung auf die Säule aufgetragen. Für das Strep-Fnr-Monomer aus *B. subtilis* wurde anhand der abgeleiteten Aminosäuresequenz eine Größe von 28,4 kDa errechnet und das dimere Fnr aus *B. subtilis* wurde dementsprechend bei einer Größe von 56,8 kDa erwartet. Die Ergebnisse der Gelfiltration zeigen für das FnrCCC, FnrS153A, FnrL155A und FnrR157A ein Elutionsvolumen von 15,8 ml, welches einer molekularen Masse von 47,8 kDa entspricht. Diese Größe entspricht ungefähr der des Dimers, was darauf schließen lässt, dass auch die Fnr-Mutantenproteine aus *B. subtilis* als Dimer vorliegen (Abb. 28).



**Abb. 28: Gelpermeationschromatographie des FnrCCC, Fnr153A, FnrL155A und FnrR157A.** (A) zeigt das FnrCCC. (B) zeigt das FnrS153A. (C) zeigt das FnrL155A. (D) zeigt das FnrR157A. (E) zeigt die Carboanhydrase, die etwa der Größe eines Fnr-Monomers (29 kDa) mit einem Elutionsvolumen von 17,2 ml entspricht. Das Elutionsvolumen der dimeren Form des FnrS liegt bei 15,8 ml

Für eine Fnr-abhängige Regulation muss der Fnr-Regulator DNA binden können. Mit Hilfe von DNaseI Footprint Analysen sollte untersucht werden, ob die anaerob gereinigten Fnr Mutantenproteine S153A, L155A sowie R157A an die Fnr-Bindesequenz des *narG*-Promotors binden können (Abb. 19, Spur 5, 6 und 7). Für die Fnr-Mutante FnrS153A, konnte eine Bindung an die DNA, sichtbar durch einen vor DNaseI geschützten Bereich, sowie eine hypersensitive Stelle an Position -44 relativ zum Transkriptionsstartpunkt, detektiert werden (Abb. 19, Spur 5). Vergleichbar mit dem FnrCCC zeigt die Mutante jedoch eine schwächere Bindung (Abb. 19, Spur 2 und 5). Spur 6 und 7 zeigen die Footprintanalyse des FnrL155A und FnrR157A. Es konnte für diese beiden Fnr-Mutanten kein vor DNaseI geschützter Bereich detektiert werden, da sie nicht in der Lage waren an die DNA zu binden.

Die *in vivo* Ergebnisse zeigen, dass die eingebrachten Mutationen in die  $\alpha$ D-Helix zu einer starken Reduktion bis hin zu einer Inaktivierung der Proteine FnrS153A, FnrL155A und FnrR157A führte (Tabelle 12). Dennoch koordinieren

die aufgereinigten Proteine ein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum (Abb. 26) und liegen als Dimer vor (Abb. 28). Die Proteine FnrL155A und FnrR157A binden nicht spezifisch an DNA (Abb. 19, Spur 6 und 7), worin der Verlust der *in vivo* Aktivität begründet ist. Die Mutante FnrS153A zeigt eine auf 30 % reduzierte Aktivität *in vivo* (Tabelle 12). Diese reduzierte Aktivität lässt sich aus der verminderten Bindung an die DNA folgern, gezeigt durch DNaseI Footprint Analysen (Abb. 19, Spur 5).

Zusammengefasst sind die Mutantenproteine in den Eigenschaften der Koordination des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums und der Oligomerisierung dem FnrCCC ähnlich, allerdings ist ihre Fähigkeit der DNA-Bindung reduziert oder inaktiviert. Durch die eingebrachte Mutation konnte kein konstitutiv aktiver Phänotyp erreicht werden. Dennoch lässt der Verlust der DNA-Bindung der Mutantenproteine den Schluss zu, dass die  $\alpha$ D-Helix des FnrS aus *B. subtilis* einen wichtigen Teil des Aktivierungsmechanismus darstellen könnte, da durch Mutationen in dieser Domäne die DNA-Bindung essentiell beeinflusst ist. Es ist vorstellbar, dass die eingebrachten Mutationen die inaktive Konformation stabilisieren oder dass sie die Reorientierung des Proteins über diese Domäne stören.

#### **4.1.9 Die Interaktion des *Bacillus subtilis* FnrS über die AR3 mit der RNA Polymerase**

Die transkriptionelle Aktivierung durch das *B. subtilis* Fnr erfolgt nach Bindung an die Erkennungssequenz der Fnr-abhängigen Promotoren und Interaktion mit der RNA Polymerase.

Die durch Computeranalysen vorhergesagte Sekundärstruktur für das Fnr aus *B. subtilis* weist dort, wo die für Fnr und Crp aus *E. coli* charakterisierte AR3 liegt, ebenfalls eine Loopstruktur auf (AS 61-65). Zur Charakterisierung der activating region drei des FnrS aus *B. subtilis* wurde mit dessen Aminosäuresequenz ein Vergleich mit den Aminosäuresequenzen des FnrS sowie Crp aus *E. coli* und dem CooA aus *Rhodospirillum rubrum* durchgeführt (Abb. 29). Der Glycinrest 64 ist in allen drei Proteinen hochkonserviert (Abb. 29). Der Glycinrest 64 befindet sich in einem Loop zwischen dem 4. und 5.  $\beta$ -Faltblatt (Abb. 29). Mutationsanalysen an Crp und Fnr aus *E. coli*, bei

denen dieser Glycinrest gegen Alanin ausgetauscht worden ist, zeigen *in vivo* eine stark reduzierte Aktivität zwischen 50 % bei Crp und 10-30 % bei Fnr (Lamberg *et al.*, 2002; Rhodius and Busby, 2000b). Es ist jedoch nicht geklärt, ob in der Wechselwirkung mit dem Sigmafaktor der Glycinrest eine wichtige Rolle spielt oder ob die bei dem Austausch des Glycinrests zu einem Alaninrest eingeführte Methylgruppe sterisch die Interaktion der mit dem Sigmafaktor wechselwirkenden Aminosäurereste stört. Diese Hypothese wird durch Versuche an dem CooA aus *R. rubrum* bestärkt (Abb. 29). Der Transkriptionsfaktor CooA gehört ebenfalls zu der Crp/Fnr-Superfamilie, in dem die AR3 Region auch hier für den Loop zwischen dem 4. und 5.  $\beta$ -Faltblatt identifiziert wurde. Allerdings stellt das CooA eine Ausnahme dar, da es anstelle des hochkonservierten Glycinrests einen Glutamatrest (E60) aufweist. Wird dieser Glutamatrest durch gerichtete Mutagenese durch einen Glycinrest ausgetauscht, steigert sich die Transkriptionsrate auf das dreifache im Vergleich zum Wildtyp (Leduc *et al.*, 2001).

|                    |      |    |                                       |                         |
|--------------------|------|----|---------------------------------------|-------------------------|
|                    |      |    | EEEEEEEELLLLLEEEEEEEEEEEEEHHHHHHLLLLL |                         |
| <i>B. subtilis</i> | Fnr  | 54 | LIEIGKLTSDCKDLTLR                     | CQKHDIVGELTLFTEEP 89    |
| <i>E. coli</i>     | Fnr  | 75 | TIKSYTITEQCDEQITG                     | FHLAGDLVGFDAIG--SGH 108 |
| <i>E. coli</i>     | Crp  | 47 | SVAVLIKDEEGKEMILSY                    | LNQGDFIGELGLFEEGQE 82   |
| <i>R. rubrum</i>   | CooA | 52 | RLRVYLVGEE-REISL                      | FYLTSGDMF-----CMH 77    |
|                    |      |    | :                                     | : :                     |
|                    |      |    |                                       | * :                     |

**Abb. 29: Alignment von Aminosäuresequenzen der AR3 des Fnr aus *B. subtilis* mit Crp und Fnr aus *E. coli*.** Vergleich des Fnr Proteins aus *B. subtilis* (NP\_391612.1), des Crp (P0ACJ8) und Fnr (P0A9E5) aus *E. coli* und des CooA aus *Rhodospirillum rubrum* (AAC45127.1). Die AR3 ist gelb unterlegt. Identische Reste sind mit Sternen oder rot markiert. Die hydrophoben Reste sind grün und geladene Reste blau gekennzeichnet. Die vorhergesagte Sekundärstruktur wird symbolisiert durch E ( $\beta$ -Faltblatt), L (Loop) und H (Helix).

Um die Funktion des hochkonservierten Aminosäurerests Gly64 in diesem potentiellen Loop zu charakterisieren, wurde durch ortsgerichtete Mutagenese Gly64 gegen einen Alaninrest ausgetauscht. Ist dieser Loop an der Interaktion mit der RNAP beteiligt, dürfen Proteine die im Bereich des Loops eine Mutation tragen, die Transkription nicht mehr initiieren. Sie dürfen jedoch keinen Einfluss auf die Bindung an die DNA zeigen. Dieses Phänomen wurde schon bei der FnrD63A Mutante beobachtet. Das Asp63 liegt ebenfalls in dem potentiellen Loop. Das Mutantenprotein zeigte eine stark reduzierte *in vivo* Aktivität, koordinierte aber ein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum und konnte spezifisch an die Erkennungssequenz der DNA binden. Die verminderte *in vivo* Aktivität könnte

auf einen Defekt in der Fähigkeit der Transaktivierung des Mutantenproteins zurückzuführen sein.

Die Rolle des Glycinrests 64 des *B. subtilis* Fnr wurde nach gezielter Mutagenese gegen einen Alaninrest im *in vivo* Komplementationssystem überprüft.

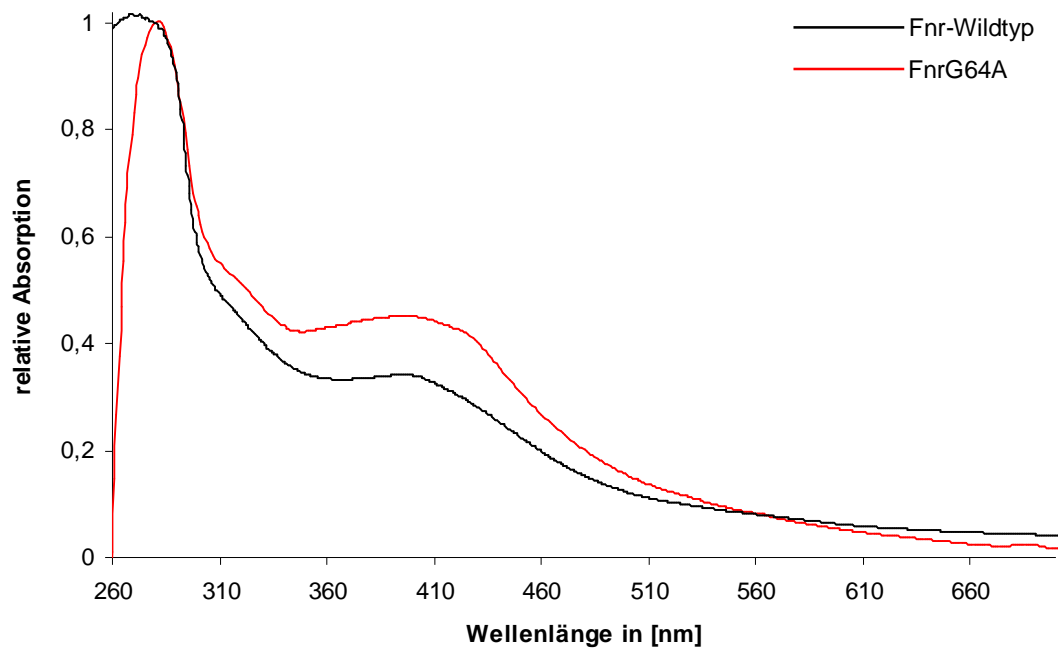
**Tabelle 14:**  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessung von *B. subtilis* Fnr, sowie FnrG64A

| Stamm                | Relevanter Genotyp                   | β-Galaktosidase-Aktivität* <sup>1</sup> |     |
|----------------------|--------------------------------------|---|-----|
|                      |                                      | (Miller Units)                          | [%] |
| <i>narG-lacZ</i>     |                                      |   |     |
| HRB3 <i>fnr</i>      | <i>fnr::spc amyE::PxylA-fnr</i>      | 291                                     | 100 |
| HRB3 <i>fnr</i> G64A | <i>fnr::spc amyE::PxylA-fnr</i> G64A | 2,25                                    | <2  |

\*<sup>1</sup> Die *fnr*-Expression wurde in allen anaerob durchgeführten Experimenten mit 2 % Xylose in SMM-Medium induziert. Zusätzlich enthielt das Medium 10 mM Nitrat. Die dargestellten Ergebnisse der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessung sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Die Standardabweichung betrug höchstens 15 %.

Für die Fnr-Mutante G64A konnte nur eine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von 2,25 Miller Units gemessen werden, was im Vergleich zum Wildtyp, mit einer Aktivität von 291 Miller Units, einer auf unter 2 % reduzierten Aktivität entspricht (Tabelle 14). Die Mutagenese des *B. subtilis* Fnr von Glycin an Position 64 zu einem Alaninrest bewirkte eine Inaktivierung des Transkriptionsfaktors. Diese Komplementation gibt allerdings keinen weiteren Aufschluss darüber, ob eine Bindung an die DNA stattfindet oder ob die Mutante noch in der Lage ist, die Transkription zu initiieren. Um das FnrG64A weitergehend *in vitro* zu charakterisieren, wurde es rekombinant als Fusionsprotein mit Strep-Tag produziert und analog wie zuvor in Kapitel (Kap. 3.9.6) beschrieben unter anaeroben Bedingungen gereinigt.

Um die Fähigkeit der Koordination eines  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums durch das Mutantenprotein zu überprüfen, wurde das FnrG64A anaerob durch UV/VIS-Spektroskopie untersucht.



**Abb. 30: UV/VIS-Absorptionsspektren von gereinigtem Wildtyp- und Fnr-Mutantenprotein G64A mit mutiertem Aspartat.** Wildtypprotein (schwarzer Graph), Proteinmutante G64A (roter Graph)

Das UV/VIS-Absorptionsspektrum des gereinigten *B. subtilis* FnrG64A-Proteins wies eine Schulter bei 420 nm auf (Abb. 30). Der Quotient  $A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ , entsprach dem des Wildtypproteins mit einem Wert von 0,43 (Tabelle 15).

**Tabelle 15:** Vergleich des gereinigten Wildtyp-Fnrs und dem Mutantenprotein FnrG64A

| Proteinbezeichnung | mutierte Aminosäure | Eisengehalt* <sup>1</sup><br>Mol Eisen : Mol Fnr | Absorption* <sup>2</sup><br>$A_{420}/A_{280}$ |
|--------------------|---------------------|--|---|
| Wt                 | -                   | 3,6:1  | 0,42  |
| G64A               | Gly64Ala            | 4:1  | 0,43  |

\*1 bestimmt nach Lovenberg

\*2 Die *fnr*-Expression und die Messung des UV/VIS-Spektrum wurde in allen Experimenten unter Ausschluss von Sauerstoff durchgeführt.

Das FnrG64A ist in der Lage unter anaeroben Bedingungen ein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum auszubilden. Die eingeführte Mutation beeinflusst also nicht die Bindung des Kofaktors.

Mit diesem gereinigten Protein wurden DNaseI Footprint Analysen durchgeführt, um die Bindung an die DNA zu untersuchen.

Spur 4 (Abb. 19) zeigt die Footprintanalyse des FnrG64A. Auch hier ist ein deutlicher Bereich zwischen -34 bis -55 relativ zum Transkriptionsstartpunkt ohne Spaltungsmuster mit hypersensitiver Stelle an Position -44 zu sehen

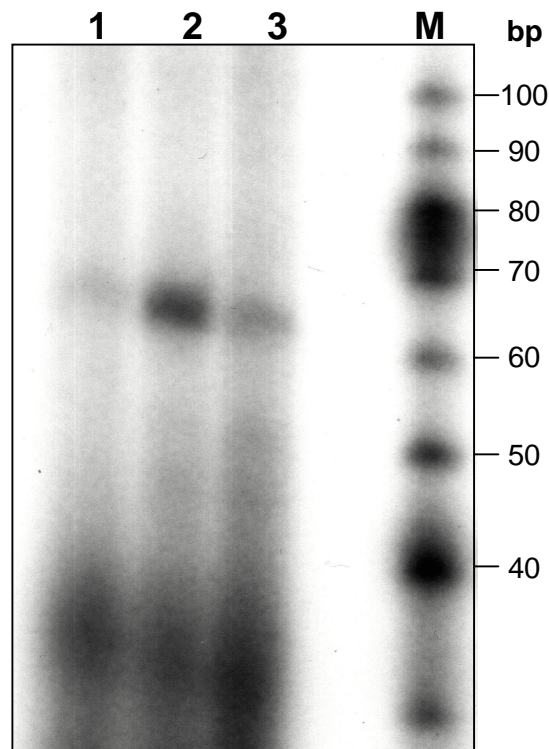
(Abb. 19, Spur 4). Das Mutantenprotein FnrG64A ist also in der Lage, *in vitro* an die DNA zu binden.

Da dieses Protein *in vivo* allerdings nicht aktiv war, sollte die Interaktion der Mutante G64A mit der RNA-Polymerase durch *in vitro* Transkriptionsanalysen untersucht werden.

Für die *in vitro* Transkription wurde mittels PCR ein 271 bp langes *narG*-Promotorfragment (Positionen -210 bis +62 relativ zum Transkriptionsstartpunkt) generiert. Da der Transkriptionsstartpunkt des *narG* bekannt ist, wird bei korrekter Initiation der Transkription ein 62 nt Transkript erwartet (Cruz-Ramos *et al.*, 1995). Für die Untersuchung wurde die RNA-Polymerase aus *B. subtilis* produziert und gereinigt (Qi and Hulett, 1998). 10 ng des gereinigten Fragments wurden ohne Fnr und mit 1,6 µM anaerob gereinigtem FnrCCC bzw. FnrG64A, sowie 50 nM gereinigter RNAP für 15 min unter anaeroben Bedingungen bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transkription wurde durch Zugabe von einem Mix aus ATP, GTP, UTP, CTP und [α-<sup>32</sup>P]CTP (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) initiiert und bei Raumtemperatur sowie anschließend bei 37 °C inkubiert. Die Transkripte wurden durch Auftrennung in einem 6 %igen denaturierenden Polyacrylamidgel mit 7 M Harnstoff analysiert und durch Auflegen auf einen Röntgenfilm sichtbar gemacht. Als Größenstandard wurde ein RNA Marker (Ambion Inc., Austin, USA) aufgetragen.

Während die *B. subtilis* RNA-Polymerase die Transkription des spezifischen *narG* Transkripts nur in geringen Maße initiiert, wird die Transkriptmenge nach Zugabe von aktivem, anaerob gereinigtem FnrCCC Mutantenprotein deutlich erhöht (Abb. 31, Spur 1 und 2). Dieses wird durch eine sichtbare Bande bei 62 bp deutlich, die der Größe des spezifischen *narG*-Transkripts entspricht (Abb. 31, Spur 2). Im Gegensatz dazu führt die Zugabe des anaerob gereinigten FnrG64A nicht zu einer verstärkten Transkription. Die resultierende Bande ist in ihrer Intensität vergleichbar mit dem Ansatz ohne Fnr (Abb. 31, Spur 3 und 1).





**Abb. 31: *In vitro* Transkription des FnrCCC und FnrG64A mit dem *narG* Promotorfragment.** Die Transkription wurde mit 50 nM *B. subtilis* RNAP und 10 ng *narG*-Fragment durchgeführt (Spur 1). Zusätzlich mit FnrCCC (Spur 2). Zusätzlich mit FnrG64A (Spur 3). Spur M zeigt die Trennung des RNA-Markers (Decade Marker, Ambion, Woodward, USA).

Obwohl FnrG64A in der Lage ist, ein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum zu koordinieren (Abb. 30, Tabelle 15) und spezifisch an DNA zu binden (Abb. 19), kann es spezifisch die Transkription zu initiieren.

Elektrostatische Wechselwirkungen des Transkriptionsfaktors mit dem Sigmafaktor der RNAP sind wichtig für die Interaktion. Die überwiegend negativ geladenen Aminosäuren der AR3 in Crp und Fnr aus *E. coli* interagieren mit den positiv geladenen Aminosäureresten Lys593, Arg596, Lys597 und Arg599 des Sigmafaktors der RNAP (Lamberg *et al.*, 2002; Rhodius and Busby, 2000b). Ein Aminosäuresequenzalignment des  $\sigma^{70}$  aus *E. coli* und  $\sigma^A$  aus *B. subtilis* zeigt, dass dieser Bereich hochkonserviert ist (Abb. 32).

|                               |     |                              |     |
|-------------------------------|-----|------------------------------|-----|
| <i>B. subtilis</i> $\sigma^A$ | 345 | RIRQIEAKALRKLRHPSRSKRLKDFLE- | 371 |
| <i>E. coli</i> $\sigma^{70}$  | 586 | RIRQIEAKALRKLRHPSRSEVLRSFLDD | 613 |
|                               |     | *****: *: .**:               |     |

**Abb. 32: Alignment der Aminosäuresequenzen des  $\sigma^A$  aus *B. subtilis* und  $\sigma^{70}$  aus *E. coli*.** Vergleich der Aminosäuresequenz des  $\sigma^A$  aus *B. subtilis* (BAA25730.1) und des  $\sigma^{70}$  aus *E. coli* (AP\_003617.1). Die Aminosäuren, die in  $\sigma^{70}$  an der Wechselwirkung mit dem Transkriptionsfaktor beteiligt sind, sind rot markiert. Identische Reste sind mit Sternen markiert.

Dieses lässt auf einen vergleichbaren Mechanismus der Transaktivierung über die AR3 in *B. subtilis* Fnr mit  $\sigma^A$  schließen. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Mutagenese des Aspartatrests Asp63 des Fnr aus *B. subtilis*. Der negativ geladene Aspartatrests D63 befindet sich ebenfalls im Loop der AR3. Der Austausch dieser Aminosäure gegen einen Alaninrest resultiert in einer stark reduzierten *in vivo* Aktivität (Tabelle 6), wobei die Bindung an die DNA jedoch nicht beeinflusst wird (Abb. 19). Durch die Mutation des negativ geladenen Aminosäurerests D63 zu einem Alaninrest geht dementsprechend die Fähigkeit der Transaktivierung verloren.

Neben den elektrostatischen Wechselwirkungen sind für die Interaktion mit dem Sigmafaktor auch hydrophobe Wechselwirkungen wichtig. Für das Fnr aus *E. coli* konnte der Aminosäurerest Ile81 und für das CooA aus *R. rubrum* Val57 identifiziert werden, die an der Interaktion mit dem Sigmafaktor beteiligt sind (Lamberg *et al.*, 2002; Leduc *et al.*, 2001). Im Alignment (Abb. 29) findet man im Fnr aus *B. subtilis* an dieser Position einen Leucinrest. Die Rolle dieses Leucinrests für die Interaktion mit dem Sigmafaktor muss in weiterführenden Arbeiten durch Mutationsanalyse untersucht werden.

#### **4.1.10 Modell des Aktivierungsmechanismus des Fnr aus *Bacillus subtilis***

Nachdem bereits 1991 die Struktur des Regulators Crp mit dem Induktor cAMP und bereits 1981 im Komplex mit DNA gelöst werden konnte, konnte 2009 die 3D-Struktur des Crps aus *E. coli* in seiner Apoform, also ohne Liganden, analysiert werden (McKay and Steitz, 1981; Schultz *et al.*, 1991; Sharma *et al.*, 2009). Das Crp ist damit das erste Protein der Crp/Fnr-Superfamilie, dessen 3D-Struktur in allen 3 Zuständen analysiert und beschrieben worden ist. Anhand dieser Strukturen war es möglich, den Aktivierungsmechanismus des Crps zu beschreiben.

Das PrfA aus *Listeria monocytogenes* konnten in einer konstitutiv aktiven Form kristallisiert werden, in der es vergleichbar mit dem Crp ist (Eiting *et al.*, 2005). Durch Aminosäuresequenzvergleiche und Mutationsanalysen des Fnr aus *B. subtilis* mit Crp und PrfA konnte gezeigt werden, dass entsprechende Domänen der Proteine vergleichbare Funktionen ausüben, so dass ein

analoger Aktivierungsmechanismus für das Fnr aus *B. subtilis* abgeleitet werden kann.

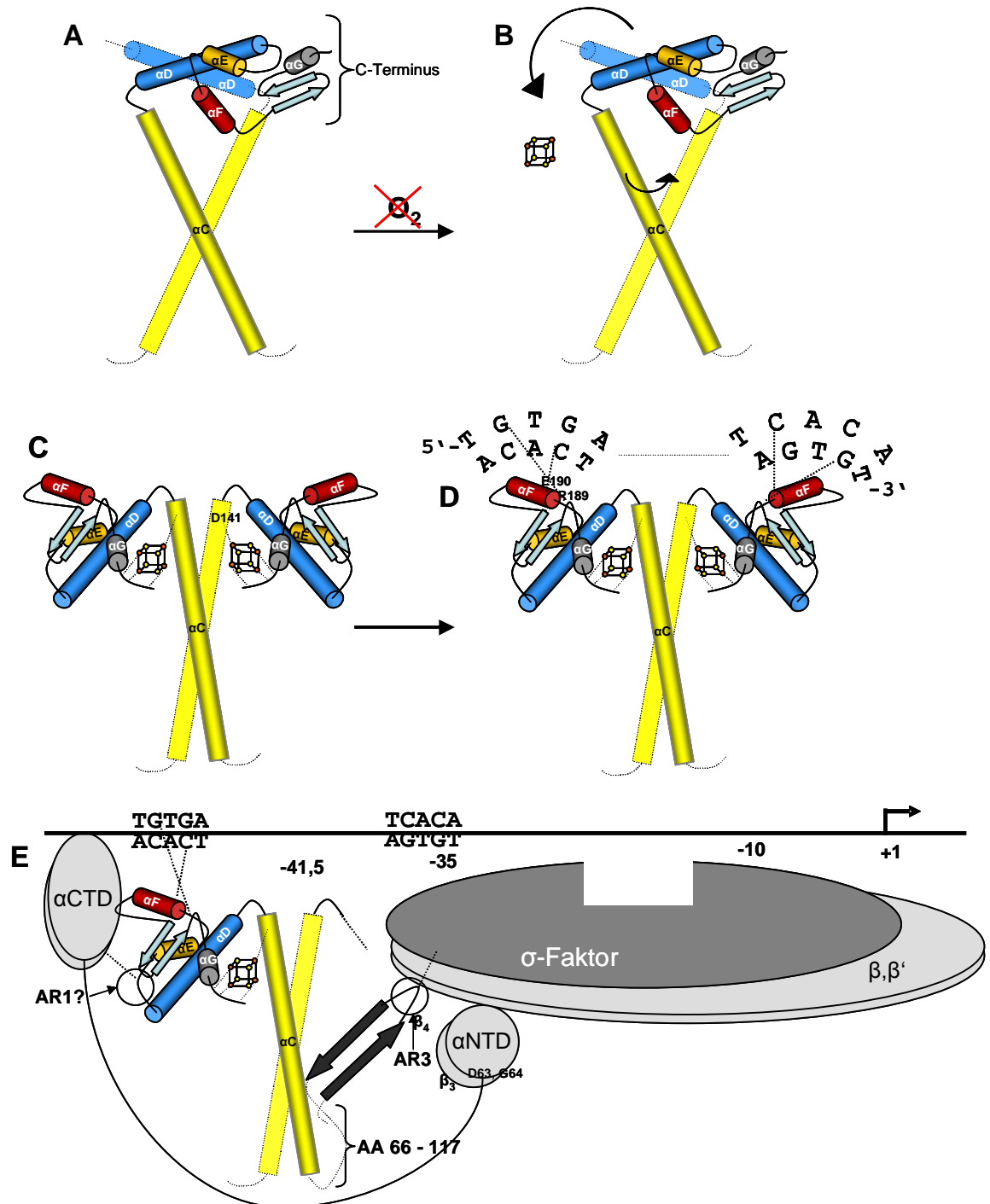
Das Fnr liegt im inaktiven Zustand als Dimer vor, wobei die Dimerisierung vermutlich über hydrophobe Reste der  $\alpha$ C-Helix erfolgt. In diesem Zustand könnte das Protein so gefaltet sein, dass die DNA-Bindedomäne durch die  $\alpha$ D-Helix maskiert ist (Abb. 33 A), so wie es für das Crp aus *E. coli* gezeigt worden ist. Die  $\alpha$ D-Helices der beiden Monomere bilden eine coiled-coil-Struktur aus, was diesen inaktiven Zustand stabilisiert. Die Aktivierung des Fnrs geschieht durch den Einbau eines  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums. Das Cluster wird über drei Cysteine (C227, 232 und 235) koordiniert, die sich in einem Loop zwischen  $\alpha$ G und  $\beta_{11}$ , sowie in  $\beta_{11}$  befinden (Reents *et al.*, 2006a). Der vierte Ligand, der Aspartatrest 141, befindet sich am Ende der  $\alpha$ C-Helix (Kap 4.1.2).

Für das Crp wurde gezeigt, dass durch Bindung des Liganden cAMP neue Wasserstoffbrücken ausgebildet werden, was dazu führt, dass sich die  $\alpha$ C-Helices aufeinander zu bewegen. Dadurch können hydrophobe Reste der  $\alpha$ C-Helices miteinander interagieren. Dies führt zu einer erweiterten  $\alpha$ C-Helix. Durch die umstrukturierte  $\alpha$ C-Helix kommt es zu einer Reorientierung des Gelenks zwischen der  $\alpha$ C- und  $\alpha$ D-Helix, was eine Verkürzung der  $\alpha$ D-Helix um einen Turn zu Folge hat. Dies destabilisiert die coiled-coil-Struktur der  $\alpha$ D-Helices. Die Maskierung der DNA-Bindedomäne entfällt und die Umorientierung der  $\alpha$ F-Helix ermöglicht die Bindung an die DNA über die  $\alpha$ F-Helix. Diese neue Orientierung wird ebenfalls von der  $\alpha$ D-Helix stabilisiert (Sharma *et al.*, 2009).

Auch im Fnr aus *B. subtilis* konnte gezeigt werden, dass die  $\alpha$ D-Helix wichtig für die DNA-Bindung ist. Mutationen in dieser Helix reduzieren oder inhibieren die Bindung an die DNA (Kap 4.1.8).

Im *B. subtilis* Fnr könnte es, ausgelöst durch die Koordination des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums über den Aspartatrest 141 und die drei Cysteinreste im C-terminalen Bereich des Fnrs zu einer ähnlichen Umstrukturierung kommen, die eine Bindung an die DNA ermöglicht (Abb. 33 B und C). Wichtig für die spezifische Bindung sind die Aminosäurereste Arg189 und E190 (Kap 4.1.7), was durch Mutationsanalysen und DNA-Bindungsstudien gezeigt werden konnte. Diese Aminosäuren bilden vermutlich Wasserstoffbrücken mit den Basen der palindromischen Sequenz G2 und 15', sowie C4 und 13' (Abb. 33 D), wie es

schon für das Crp aus *E. coli* gezeigt werden konnte (Ebright, 1991; Parkinson *et al.*, 1996; Schultz *et al.*, 1991). Durch die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA, kann die RNA-Polymerase binden. Das Fnr interagiert vermutlich über die AR3 mit dem Sigma-Faktor der RNA-Polymerase (Kap. 4.1.9) (Abb. 33 E). Ob das Fnr eine funktionelle AR1 besitzt, über die es mit der  $\alpha$ CTD der RNAP interagiert, muss noch geklärt werden. Jedoch ist ein vergleichbarer Loop in der Sekundärstruktur des Fnr aus *B. subtilis* zu finden.



**Abb. 33: Hypothetisches Modell des Aktivierungsmechanismus des Fnr aus *B. subtilis*.** (A) Dargestellt ist das dimere Fnr im inaktiven Zustand. In gelb gezeigt ist die  $\alpha$ C-Helix der Monomere. Zur Veranschaulichung wurde nur der komplette C-Terminus eines Monomers dargestellt. Die  $\alpha$ D-Helix ist für beide Monomere gezeigt. Auf die Darstellung des N-Terminus wurde verzichtet. Die  $\alpha$ D-Helices bilden eine coiled-coil-Struktur aus und maskieren dadurch das Helix-Turn-Helix-Motiv, also die  $\alpha$ E- und  $\alpha$ F-Helix. (B, C) In anaerober Umgebung findet der Einbau eines Fe-S-Zentrums statt. Durch diesen Einbau kommt es zu einer Umstrukturierung im Protein. Die  $\alpha$ C-Helices rücken näher zusammen, wodurch es zu einer Verlängerung kommt. Dadurch findet eine Umstrukturierung der  $\alpha$ D-Helices statt, wodurch die coiled-coil-Struktur der Helices destabilisiert wird, und das Helix-Turn-Helix-Motiv nicht länger maskiert ist, sondern nach außen exponiert wird. Dargestellt ist der komplette C-Terminus beider Monomere. (D) Über die  $\alpha$ F-Helices der DNA-Bindungsdomäne kommt es zur Bindung an den spezifischen Promotor. Besonders wichtig für die spezifische Bindung sind die Aminosäurereste Arg189 und

Glu190. Diese bilden Wasserstoffbrücken zu Basen der palindromischen Sequenz aus. (E) Dargestellt ist der C-Terminus nur eines Monomers sowie die Aminosäuren 54-72 des N-Terminus eines Monomers. Die Aminosäuren 54-72 organisieren sich in 2  $\beta$ -Faltblätter ( $\beta_3$  und  $\beta_4$ ) sowie einen Loop, die Activating region 3 (AR3). Durch die Bindung des FnrS an die DNA kann es zur Bindung der RNAP kommen. Die Bindung wird durch die Wechselwirkung der AR3 an den Sigma-Faktor stabilisiert. Vermutlich kommt es zu einer Wechselwirkung der hypothetischen AR1 mit der  $\alpha$ CTD der RNAP. Die Transkription spezifischer Gene wird initialisiert.

#### 4.1.11 Experimente zur Kristallisation des *Bacillus subtilis* FnrS

Für mehrere Mitglieder der Crp/Fnr-Superfamilie konnte die Kristallstruktur durch Röntgenstrukturanalyse gelöst werden. Das Crp aus *E. coli* ist das einzige Mitglied dieser Familie, dessen Struktur in drei unterschiedlichen Zuständen analysiert werden konnte. (McKay and Steitz, 1981; Schultz *et al.*, 1991; Sharma *et al.*, 2009). Weitere kristallisierte Vertreter dieser Gruppe sind das CooA aus *R. rubrum*. Das CooA besitzt als aktives Zentrum ein Häm, das Kohlenmonoxid (CO) bindet. In der CO gebundenen Form reguliert es die Expression der Gene, die für den CO Metabolismus zuständig sind. Die Kristallstruktur konnte für die Häm gebundene Form gelöst werden (Lanzilotta *et al.*, 2000). Ein weiteres Beispiel ist das PrfA aus *Listeria monocytogenes*. Der Regulator PrfA reguliert nach Infektion die Expression der Virulenzgene. Die Struktur für das Wildtyp PrfA, sowie die Struktur für eine konstitutiv aktive Mutante konnten gelöst werden. Für das PrfA konnte bislang noch kein Kofaktor identifiziert werden (Eiting *et al.*, 2005). Kristallstrukturen von Sauerstoffregulatoren dieser Familie, also Regulatoren mit  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum, liegen bisher noch nicht vor.

Um die Struktur des FnrS aus *B. subtilis* aufzuklären und die Ergebnisse der Mutationsanalysen zu bestätigen, wurden Kristallisationsexperimente unter anaeroben Bedingungen durchgeführt.

Für die Kristallisation wurde das Fnr Mutantenprotein FnrCCC eingesetzt. In diesem Protein wurden die Cysteinreste des *B. subtilis* Fnr, die nicht an der Koordination des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums beteiligt sind, durch Serinreste ausgetauscht. Diese Mutationen erhöhen die Löslichkeit des Proteins. Das FnrCCC Mutantenprotein zeigt eine *in vivo* Aktivität vergleichbar mit dem Wildtyp Fnr (Reents *et al.*, 2006a). Das FnrCCC wurde als Fusionsprotein mit N-terminalen Strep-Tag in dem Vektor pASK45+ (IBA, Göttingen) in *E. coli* BL21C+-Zellen rekombinant produziert und anaerob über eine Strep-Tag Säule

chromatographisch gereinigt (Kap. 3.6.9), so wurden aus 1 l Kulturflüssigkeit 2 mg Protein gewonnen. Das Vorhandensein des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums wurde jeweils nach der Reinigung durch UV/VIS-Spektroskopie überprüft. Erfolgreiche Kristallisationsexperimente bei Regulatoren der Crp/Fnr-Familie wurden mit einer Proteinkonzentration von 5-7 mg/ml durchgeführt. Das Kristallwachstum benötigte eine Zeit von drei bis fünf Tagen.

Das FnrCCC wurde in einer Konzentration von 5-10 mg/ml, in einem Puffer, bestehend aus 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM DTT pH 8 für die Kristallisation eingesetzt. Dialyseversuche gegen 10 mM Tris-HCl pH 8 mit 150, 100 und 50 mM NaCl resultierten in Aggregatbildung des Proteins.

Für die Kristallisation wurden die Screens Hampton Crystal Screen I und II (Hampton Research, USA) verwendet, sowie die folgenden Screens von Nextal (Quiagen GmbH, Deutschland) Classics Lite, Cryos Suites, pHClear II Suites, Anions und Cations Suites, PEGs Suites MPD, Suites, MbClass und MbClass II Suites.

Für die Kristallisation wurde sowohl die „sitting drops“ als auch die „hanging drops“ Methode verwendet. Für die „sitting drops“ Methode wurden 96 Well Platten verwendet. Das Reservoir wurde mit 90 µl Kristallisationspuffer befüllt und 1 µl Protein mit 1 µl Puffer vermischt. Für die „hanging drops“ wurden 24 Well Platten gewählt. Das Reservoir wurde mit 500 µl Kristallisationspuffer befüllt. 1 µl Protein wurde mit 1 µl Kristallisationspuffer auf einem Gläschen vermischt und auf das Reservoir aufgelegt. Die Kristallisationsansätze wurden bei 17 °C in einer Anaerobox inkubiert. Der Kristallisationserfolg wurde erstmals nach 3 Tagen, dann wöchentlich überprüft.

Für keine der Bedingungen konnte ein Kristallisationserfolg erzielt werden.

In 50 % der Bedingungen fällt das Protein amorph aus. Ein Grund dafür könnte sein, dass keine 100%ige Einbaurate des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums in das Protein erreicht wurde, welches in einer inhomogenen Proteinlösung resultiert, die die Kristallbildung stört. Weiter könnte der flexible N-terminale Strep-Tag die Kristallbildung verhindern.

Um diesem entgegenzuwirken, wurden andere Expressionssysteme getestet. Dafür wurden der Vektor pASKIBA13+ (IBA, Göttingen) mit einer Thrombin-Schnittstelle und einem N-terminalen Strep-Tag (Tabelle 16), der Vektor pASKIBA43+ (IBA, Göttingen) mit einem N-terminalen 6xHistidin-Tag

(Tabelle 16), der Vektor pET-5a (Novagen, Deutschland) ohne Tag (Tabelle 16), der Vektor pET-32a (Novagen, Deutschland) mit einem N-terminalen Thioredoxin-Tag, 6xHistidin-Tag und einem S-Tag (Tabelle 16) und der Vektor pET-52b (Novagen, Deutschland) mit einem N-terminalen Strep-Tag (Tabelle 16) getestet. Die N-terminale Position des Affinitätstags wurde gewählt, um den Einbau des C-terminal koordinierten  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums nicht zu behindern.

Die Produktion und Reinigung des FnrCCC im Vektor pASKIBA-13+ war erfolgreich. Der Strep-Tag konnte durch Thrombin erfolgreich abgespalten werden. Allerdings war die Ausbeute an Protein zu gering und eignete sich daher nicht als neues Expressionssystem für die Kristallisation des FnrCCC. Das FnrCCC konnte in den Vektoren pASKIBA-43+, pET-5a und pET-52b nicht erfolgreich als lösliches Protein überproduziert werden. Im Vektor pET-32a fand eine erfolgreiche Produktion des FnrCCC mit N-terminalen Histidin-Tag statt, jedoch kam es zu Problemen bei der Reinigung. Um das Eisen-Schwefel-Zentrum des Fnr bei der anaeroben Reinigung vor Oxidation zu schützen, wird dem Puffer ein Reduktionsmittel hinzugefügt. Die eingesetzten Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT) und Natriumthiosulfat reagierten jedoch mit den Nickel-Ionen der Nickelsäule, über die das Protein chromatographisch gereinigt werden sollte.

**Tabelle 16:** Eingesetzte Vektoren zur rekombinanten Produktion des FnrCCC aus *B. subtilis*

| Vektor      | Promotor | Tag N-terminal   | Protease Schnittstelle | Größe des FnrCCC mit Tag in kDa | Produktion | Reinigung |
|-------------|----------|------------------|------------------------|---------------------------------|------------|-----------|
| pASKIBA-13+ | Tet      | Strep-Tag        | Thrombin               | 28                              | +          | +         |
| pASKIBA-43+ | Tet      | 6xHis-Tag        | -----                  | 28,5                            | -          | -         |
| pET-5a      | T7       | -----<br>Trx-Tag | -----                  | 27,2                            | -          | -         |
| pET-32a     | T7       | His-Tag<br>S-Tag | Enterokinase           | 42,2                            | +          | -         |
| pET-52b     | T7       | Strep-Tag        | HRV 3C                 | 29,6                            | -          | -         |



Die Etablierung eines neuen Expressionssystem für das FnrCCC aus *B. subtilis* war nicht erfolgreich. Da ein neues Expressionssystem keinen Einfluss auf die Stabilität des Proteins hat, sollte für weitergehende Experimente ein Fnr-Protein aus einem anderen Organismus untersucht werden. Hierfür wurde das Fnr aus dem thermophilen *Geobacillus stearothermophilus* gewählt.

## 4.2 Die biochemische Charakterisierung des FnrCCCC aus *Geobacillus stearothermophilus*

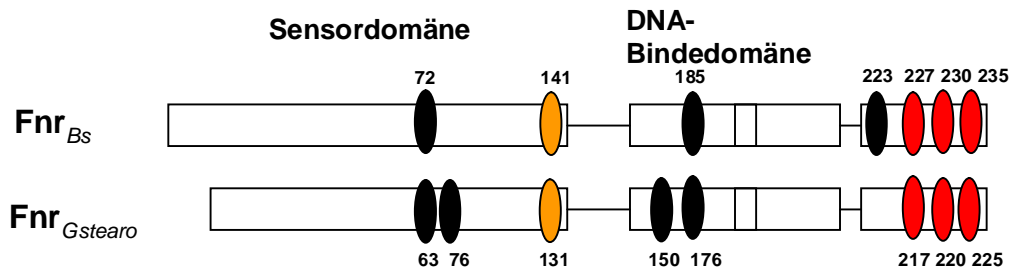
*Bacillus stearothermophilus* wurde 2001 in *Geobacillus stearothermophilus* umbenannt. Die optimale Wachstumstemperatur dieses Bakteriums liegt zwischen 50 und 65 °C, womit *G. stearothermophilus* zu den thermophilen Mikroorganismen zählt. Im Genom dieses Organismus, erhältlich in der ERGO Datenbank (<http://ergo.integratedgenomics.com>), kodieren zwei Gene für zwei unterschiedliche Fnr Proteine, benannt als Fnr 1312 und Fnr 2045. Weiterhin wurden Gene, die eine Übereinstimmung mit dem *narGHJI*-Operon und *narK* aufweisen, annotiert. Die Fnr Gene 1312 und 2045 des *G. stearothermophilus* wurden für Komplementationsversuche in den *B. subtilis* Fnr-Knock-out-Stamm HRB3 (*fnr::spc narG-lacZ*) eingebracht, und deren Funktionalität über die Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Nur das Fnr 2045 konnte die Deletion in *B. subtilis* zu 40 % komplementieren, im Gegensatz zum Fnr 1312, der keine Aktivität zeigte (Lüders, 2006). Die Aminosäuresequenz des Fnr 2045 besitzt eine hohe Identität von 57,1 % und eine hohe Ähnlichkeit von 70,2 % im Vergleich zur Aminosäuresequenz des Fnr aus *B. subtilis*.

Die thermophile Lebensweise von *G. stearothermophilus* ließ die Vermutung zu, dass Proteine dieses Organismus stabiler sein könnten verglichen mit denen von mesophilen Organismen wie *B. subtilis*. Es sollte daher überprüft werden, ob das gereinigte Fnr 2045 aus *G. stearothermophilus* stabiler ist im Vergleich zum Fnr aus *B. subtilis*. Dies könnte optimalere Bedingungen für Kristallisationsexperimente bieten.

Das Fnr aus *B. subtilis* koordiniert ein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum über die Cysteinreste Cys227, Cys230 und Cys235, sowie über den Aspartatrest Asp141. Aminosäuresequenzvergleiche zeigen, dass diese drei Cysteinreste im *G. stearothermophilus* als Cys217, Cys220 und Cys225 und der Aspartatrest als Asp131 konserviert sind (Abb. 16).

In der weiteren Arbeit wird nur noch mit dem Fnr 2045 aus *G. stearothermophilus* gearbeitet, zur besseren Verständlichkeit wird es nur noch als Fnr bezeichnet. Für das Fnr aus *B. subtilis* konnte eine höhere Stabilität des Proteins durch Mutation der drei Cysteinreste Cys72, Cys185 und Cys223, die nicht an der Koordination des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums beteiligt sind,

gezeigt werden. Im Fnr Protein aus *G. stearotherophilus* finden sich, neben den konservierten Cysteinresten vier weitere Cysteinreste (Cys63, Cys76, Cys150 und Cys176) (Abb. 34). Diese wurden ebenfalls ausgetauscht, um so die Löslichkeit des Proteins zu erhöhen.



**Abb. 34: Strukturelle Organisation des *B. subtilis* Fnr im Vergleich zum *G. stearotherophilus* Fnr 2045.** Die Cysteinreste des *B. subtilis* Fnr-Proteins (Fnr<sub>Bs</sub>), die an der Koordination des Eisen-Schwefel-Zentrums beteiligt sind, sind rot markiert, der Aspartatrest ist gelb markiert. Cysteinreste Fnr<sub>Bs</sub>, die nicht an der Koordination des Eisen-Schwefel-Zentrums beteiligt sind, sind schwarz markiert. Das DNA-Bindungs-Motiv ist als schwarz umrahmte Box (RE-R) dargestellt. Analog dazu die Darstellung auf das Fnr2045-Protein aus *G. stearotherophilus* übertragen (Lüders, 2006).

Die Cysteinreste Cys63, Cys76, Cys150 und Cys176 des Fnr<sub>Gstearo</sub> wurden durch ortsgerichtete Mutagenese gegen Alaninreste ausgetauscht. Diese Mutante zeigte im Komplementationstest eine Aktivität von 66 % im Vergleich zum Wildtyp (Lüders, 2006).

#### 4.2.1 Etablierung eines Expressionssystem zur Produktin des FnrCCCC aus *Geobacillus stearotherophilus*

Das *fnrCCCC*-Gen wurde zur rekombinanten Produktion in *E. coli* in verschiedene Expressionssysteme kloniert. Getestet wurden die Vektoren pASKIBA43+ (IBA, Göttingen) mit einem N-terminalen 6xHistidin-Tag und einen mit Anhydrotetracyclin induzierbaren Tetracyclin-Promotor (Tet). Dieser Vektor besitzt keine Protease-Schnittstelle, um den 6xHistidin-Tag abzuspalten (Tabelle 17). Der Vektor pET-5a (Novagen, Deutschland) besitzt keinen Affinitätstag. Die Proteinproduktion wird durch den IPTG induzierbaren-T7-Promotor gesteuert (Tabelle 17). Der Vektor pET-32a (Novagen, Deutschland) besitzt einen N-terminalen Thioredoxin-Tag (Trx-Tag), 6xHistidin-Tag und einen S-Tag. Eine Proteaseschnittstelle für die Enterokinase ist vorhanden und der T7-Promotor wird durch die Zugabe von IPTG induziert (Tabelle 17). Der Vektor

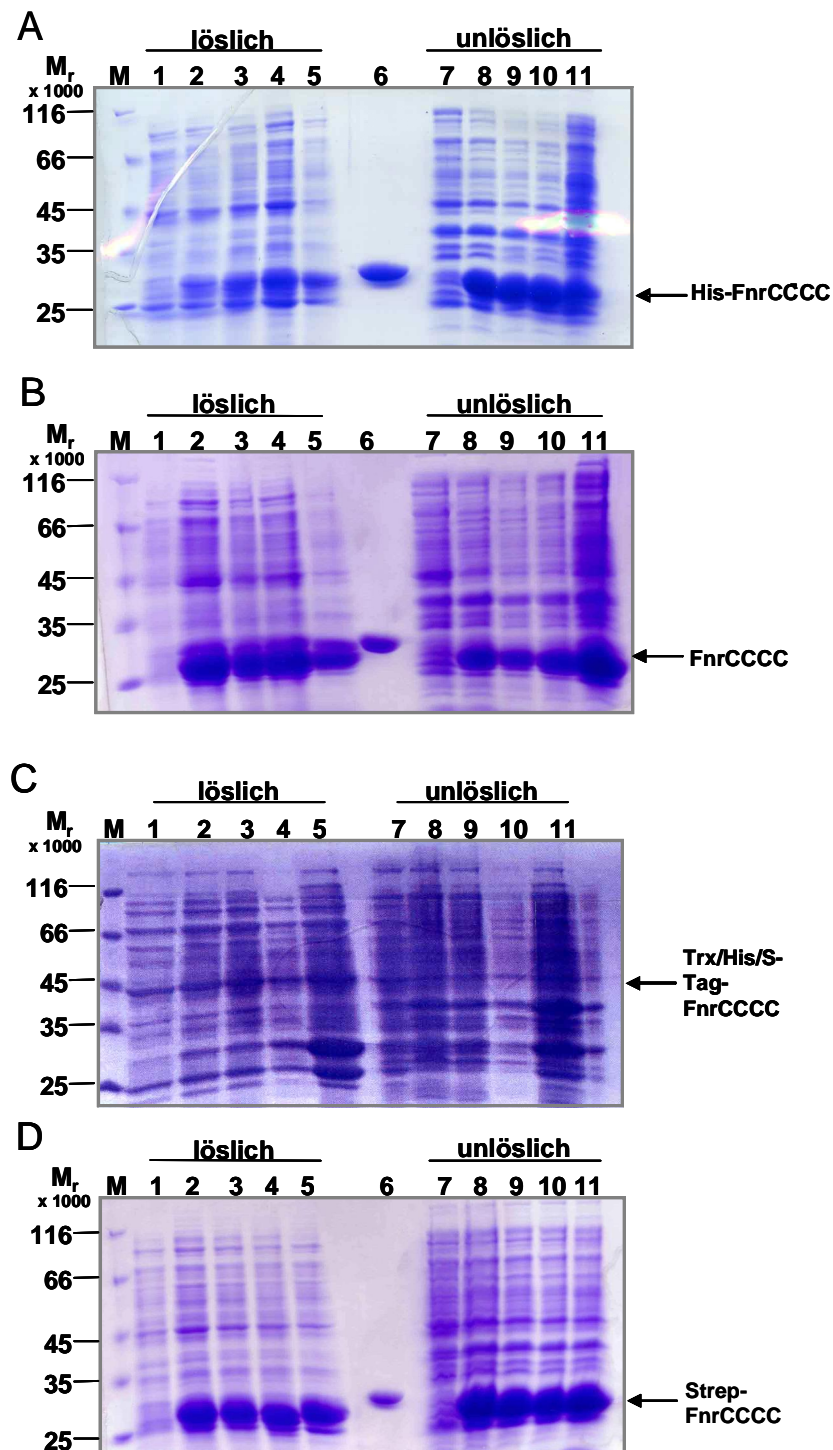
pET-52b (Novagen, Deutschland) besitzt einen N-terminalen Strep-Tag, der über eine HRV 3C Protease abgespalten werden kann. Weiterhin besitzt er für die Proteinproduktion einen T7-Promotor (Tabelle 17).

**Tabelle 17:** Eingesetzte Vektoren zur rekombinanten Produktion des FnrCCCC aus *G. stearotheophilus*

| Vektor      | Promotor | Tag N-terminal   | Protease Schnittstellen | Größe des FnrCCCC mit Tag in kDa | Produktion | Reinigung |
|-------------|----------|------------------|-------------------------|----------------------------------|------------|-----------|
| pASKIBA-43+ | Tet      | 6xHis-Tag        | -----                   | 27,3                             | -          | -         |
| pET-5a      | T7       | -----<br>Trx-Tag | -----                   | 26                               | +          | -         |
| pET-32a     | T7       | His-Tag<br>S-Tag | Enterokinase            | 41                               | -          | -         |
| pET-52b     | T7       | Strep-Tag        | HRV 3C                  | 28,4                             | +          | +         |

Zur Proteinproduktion wurde der *E. coli*-Stamm BL21CD+(DE3)-RIL (Stratagene, La Jolla, USA) mit den Plasmiden pASKIBA-43+*fnrCCCC*, pET-5a*fnrCCCC*, pET-32a*fnrCCCC* oder pET-52b*fnrCCCC* transformiert. Mit diesen neu entstandenen Plasmid Stämmen wurden Expressionstests durchgeführt. Dafür wurden je 100 ml LB-Medium mit einer Übernachtskultur beimpft und bei 37 °C bis zur Induktion der Proteinproduktion inkubiert. Da die Expression des Fusionsproteins unter der Kontrolle des Tetracyclin-abhängigen *Tet*-Promotors oder des T7-Promotors steht, war die Induktion der Proteinproduktion durch Anhydrotetracyclin oder IPTG möglich. Nach Erreichen einer OD<sub>578nm</sub> von 1 wurde die Proteinproduktion mit 300 nM IPTG oder 1,4 µM Anhydrotetracyclin induziert. Nach Induktion der rekombinanten Genexpression wurde die Wachstumstemperatur auf 25 °C verringert. Zur Überprüfung der Proteinproduktion wurden Kulturproben nach 2, 3, 4 und 16 Stunden genommen, nach löslicher und unlöslicher Fraktion getrennt und durch SDS-PAGE überprüft.

Das errechnete Molekulargewicht des FnrCCCC ohne Tag betrug 26 kDa. Für das His-FnrCCCC Fusionsprotein wurde eine relative molekulare Masse von 27,3 kDa, für das Trx/His/S-Tag-FnrCCCC Fusionsprotein 41 kDa und für das Strep-FnrCCCC Fusionsprotein 28,4 kDa erwartet.



**Abb. 35 Rekombinante Produktion verschiedener FnrCCCC-Proteine mit unterschiedlichen Vektoren.** Gezeigt ist das Proteingemisch des Zellextrakts aus *E. coli* BL21C+-Zellen mit (A) *fnrCCCC* in pASKIBA43+, (B) *fnrCCCC* in pET5a, (C) *fnrCCCC* in pET32a, (D) *fnrCCCC* in pET52b. Getrennt nach löslicher Fraktion (Spur 1-5) und unlöslicher Fraktion (Spur 7-11). (Spur 1 und 7) vor Induktion, (Spur 2 und 8) 2 Stunden nach Induktion, (Spur 3 und 9) 3 Stunden nach Induktion, (Spur 4 und 10) 4 Stunden nach Induktion, (Spur 5 und 11) 16 Stunden nach Induktion, (Spur 6) Positivkontrolle FnrCCC aus *B. subtilis*. Spur M zeigt die Trennung von Markerproteinen (Protein Molecular Weight Marker, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Die relative molekulare Masse ist angegeben. Der Zellextrakt wurde nach Zugabe von SDS-PAGE-Probenpuffer 15 Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend durch ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel getrennt. Die Proteine wurden durch Coomassie Brilliant Blau-Färbung visualisiert.

Bei allen vier untersuchten Expressionssystemen wird sichtbar, dass erst nach Induktion der rekombinanten Genexpression eine deutliche Produktion des Fusionsproteins erreicht wurde.

Mit dem Expressionssystem pASKIBA-43+*fnrCCCC* wurde wenig FnrCCCC-Fusionsprotein in der cytoplasmatischen Fraktion produziert (Abb. 35 A, Spur 2-5). Der größte Teil des gebildeten rekombinanten Proteins war unlöslich (Abb. 35 A, Spur 8-11). Das Expressionssystem pET-5a*fnrCCCC* erbrachte lösliches (Abb. 35 B, Spur 2-5) und unlösliches (Abb. 35 B, Spur 8-11) FnrCCCC in äquivalenten Mengen. Für das Konstrukt pET-32a*fnrCCCC* konnte in keiner Fraktion produziertes rekombinantes Protein detektiert werden (Abb. 35 C). Wohingegen das Expressionssystem pET-52b*fnrCCCC*, wie auch schon zuvor für das Konstrukt pET-5a*fnrCCCC* beschrieben, FnrCCCC-Fusionsprotein in löslicher (Abb. 35 D, Spur 2-5) und unlöslicher (Abb. 35 D, Spur 8-11) Form in äquivalenten Mengen erbrachte (vergl. Tabelle 17).

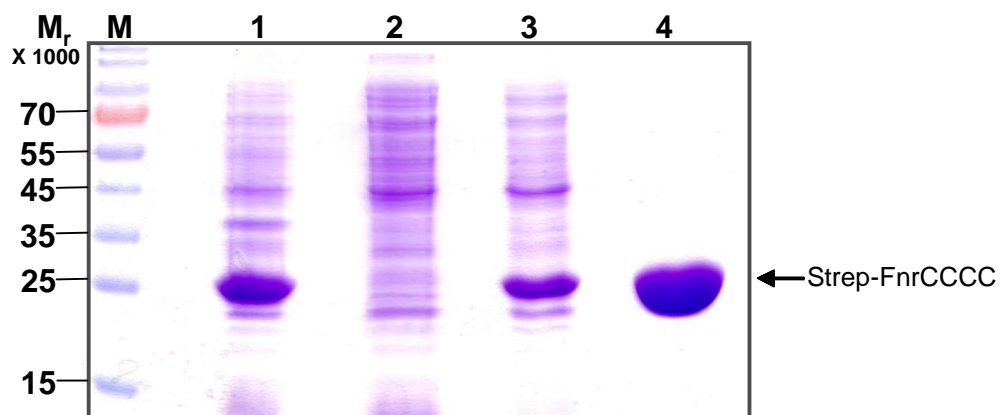
Zur weiteren Untersuchung des FnrCCCC sollte das Konstrukt pET-52b*fnrCCCC* genutzt werden. Wie bereits mit dem Fnr aus *B. subtilis* gezeigt wurde, ist dieses System geeignet, da der N-terminale Strep-Tag eine einfache Reinigung und eine hohe Reinheit des Proteins gewährleistet, welches für die Kristallisation notwendig ist. Außerdem ist es möglich, den N-terminalen Strep-Tag über die HRV 3C Proteaseschnittstelle zu entfernen.

#### **4.2.2 Etablierung einer chromatographischen Reinigung des Strep-FnrCCCC aus *Geobacillus stearothermophilus***

Der Vektor pET52b erlaubt eine Produktion des FnrCCCC als Fusionsprotein mit N-terminalem Strep-Tag. Der Strep-Tag des rekombinanten Proteins bindet hochaffin, nicht kovalent an das Säulenmaterial Strep-Tactin. Dadurch ergibt sich eine deutlich höhere Verweildauer des rekombinanten Proteins am Säulenmaterial, während die übrigen, in der löslichen Fraktion enthaltenen Proteine keine Affinität zur stationären Phase aufweisen und früher eluieren.

Die Zellen wurden in 1 l Erlenmeyerkolben in 500 ml LB Medium kultiviert. Dem LB Medium wurden 10 mM NaNO<sub>3</sub> und 1 mM Fe(III)-Citrat als Eisenquelle hinzu gegeben. Beim Erreichen einer OD<sub>578nm</sub> von 1 wurde die rekombinante Proteinproduktion mit 300 nM IPTG induziert, und die Wachstumstemperatur

auf 25 °C verringert. Aufgrund des Ergebnisses des Expressionstests (Kap. 4.2.1) wurde eine Proteinproduktion von 16 Stunden gewählt. Die der Proteinproduktion folgenden Schritte wurden im Anaerobenzelt unter stickstoffhaltiger Atmosphäre durchgeführt, um eine Rekonstitution des möglichen  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums zu gewährleisten, wie es schon für das Fnr aus *B. subtilis* gezeigt worden ist. Vor der Zellernte erfolgte eine zweistündige Inkubation bei RT im Anaerobenzelt (Reents, 2005; Reents Dissertation, 2005). Nach der Zellernte durch Zentrifugation erfolgte ein anaerober Zellaufschluss mittels French Press. Anschließend wurden Zelltrümmer und unlösliche Proteine durch Zentrifugation von der löslichen Fraktion abgetrennt. Die lösliche Fraktion wurde im Anaerobenzelt auf eine mit Strep-Tactin beladene Tropfsäule aufgetragen, welche zuvor mit 5 Volumen Chromatographiepuffer äquilibriert wurde. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte mit 2,5 mM Desthiobiotin. Das Desthiobiotin besitzt eine ebenso hohe Affinität gegenüber dem Säulenmaterial wie der Strep-Tag. Auf Grund dessen konkurriert das Desthiobiotin mit dem Strep-Tag um die Bindungsstellen der stationären Phase und verdrängt so das gebundene Fusionsprotein. Nach jedem Schritt der Proteinreinigung wurden zur Überprüfung Proben genommen und über SDS-PAGE analysiert (Abb. 36).

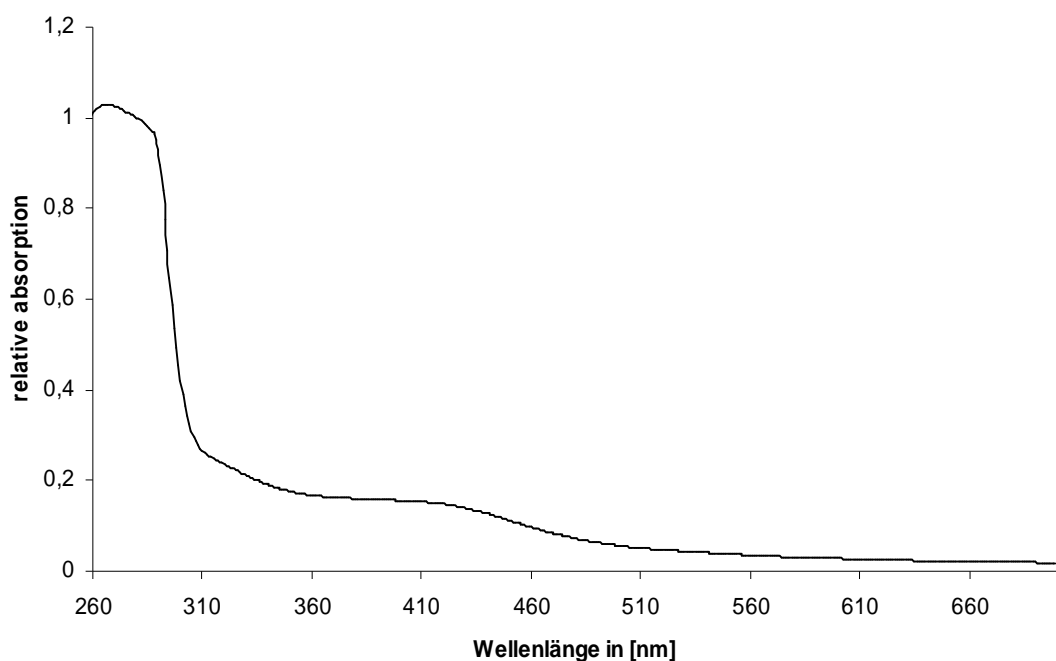


**Abb. 36: Produktion und Affinitätsreinigung des *G. stearothermophilus* FnrCCCC.** Gezeigt sind die Proteingemische aus *E. coli* 16 Stunden nach der Induktion (Spur 1), (Spur 2) zeigt den Durchfluss nach Auftragen auf die Strep-Tactin Säule, (Spur 3) zeigt die Waschfraktion des Waschschritts und (Spur 4) zeigt das gereinigte FnrCCCC. (Spur M) zeigt die Trennung von Markerproteinen (Prestained ProteinLadder, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Die relative molekulare Masse der Markerproteine ist angegeben. Gereinigtes Fnr und Proteine der cytoplasmatischen Fraktion (Spur 1-3) wurden nach Zugabe von SDS-PAGE-Probenpuffer 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und durch 13,2%ige SDS-PAGE getrennt. Durch eine Coomassie Brilliant Blau-Färbung werden die Proteine visualisiert.

Aus 1 l Kulturmedium konnten bis zu 20 mg gereinigtes Fusionsprotein gewonnen werden.

#### 4.2.2.1 Spektroskopische Untersuchungen des FnrCCCC aus *Geobacillus stearothermophilus*

Der Nachweis des koordinierten  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums durch das FnrCCCC aus *G. stearothermophilus* erfolgte durch UV/VIS-Spektroskopie (Abb. 37). Als weiteres Kriterium wurde die Menge an eingebautem Eisen analysiert. Die Bestimmung des Eisengehalts erfolgte nach Lovenberg (Lovenberg *et al.*, 1963). Der Quotient aus  $A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  wurde genutzt, um den Eisen-Schwefel Einbau des FnrS aus *B. subtilis* mit dem des FnrCCCC aus *G. stearothermophilus* zu vergleichen. Das gereinigte FnrCCCC wurde unter anaeroben Bedingungen spektroskopisch vermessen.



**Abb. 37:** UV/VIS-Absorptionsspektren von gereinigtem FnrCCCC. Dargestellt ist das FnrCCCC (schwarzer Graph).

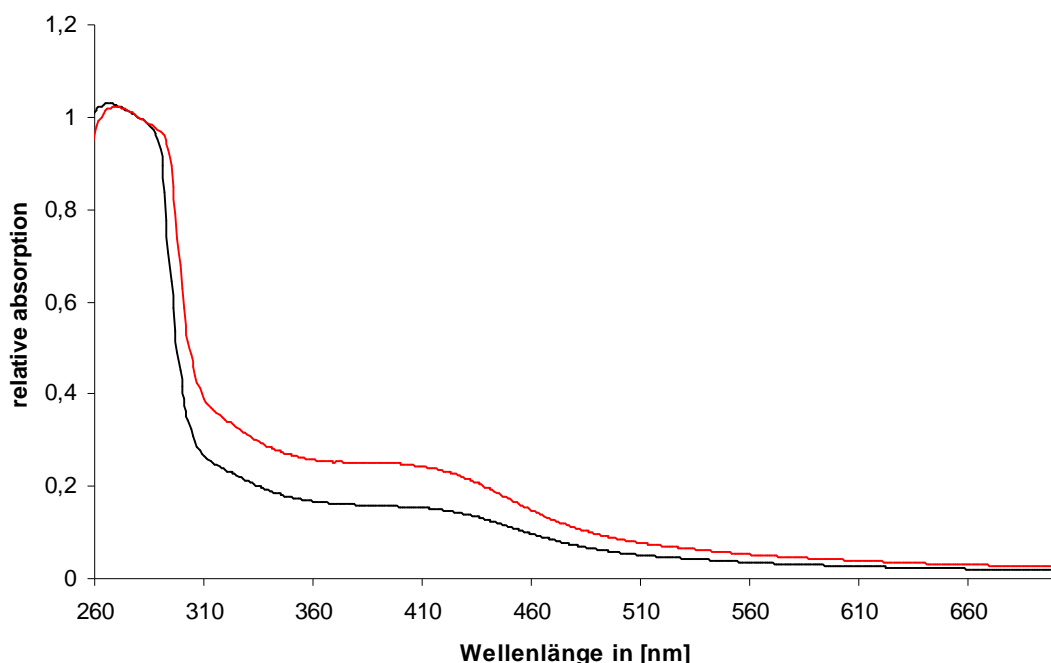
Das FnrCCCC aus *G. stearothermophilus* zeigte eine schwache Schulter bei 420 nm. Ein solches Absorptionsspektrum ist spezifisch für das Vorhandensein eines  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums (Reents *et al.*, 2006a). Der Quotient  $A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  mit einem Wert von 0,15 des FnrCCCC entspricht jedoch nur zu 33 % dem des Fnr Wildtyps aus *B. subtilis* (Kap 4.1.2.2, Tabelle 7). Der gemessene Eisengehalt



ergab nur 2 Mol Eisen pro Mol FnrCCCC. Dies entsprach nur zu 50 % dem gemessenen Eisengehalt des FnrS aus *B. subtilis* entsprach (Kap 4.1.2.2, Tabelle 7).

Dies ist ein erster Hinweis auf das Vorhandensein eines  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums, als Kofaktor des FnrCCCC aus *G. stearothermophilus*. Um eine höhere Rekonstitution eines möglichen  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum in dem FnrCCCC zu erreichen, wurde die Proteinproduktion optimiert.

Hierfür wurde dem Medium zusätzlich als Schwefelquelle 1 mM Cystein hinzugegeben. Nach Induktion der rekombinanten Proteinproduktion mit IPTG wurden die Zellen für drei Stunden bei einer Temperatur von 25 °C aerob im Erlenmeyerkolben inkubiert. Daraufhin wurde die Kultur in eine Anaerobenflasche überführt, und die Proteinproduktion wurde für weitere 13 Stunden bei 25 °C unter anaeroben Bedingungen fortgesetzt. Die Reinigung erfolgte wie zuvor beschrieben über eine Strep-Tactin-Säule. Das so produzierte FnrCCCC wurde ebenfalls durch UV/VIS-Spektroskopie vermessen (Abb. 38, roter Graph).



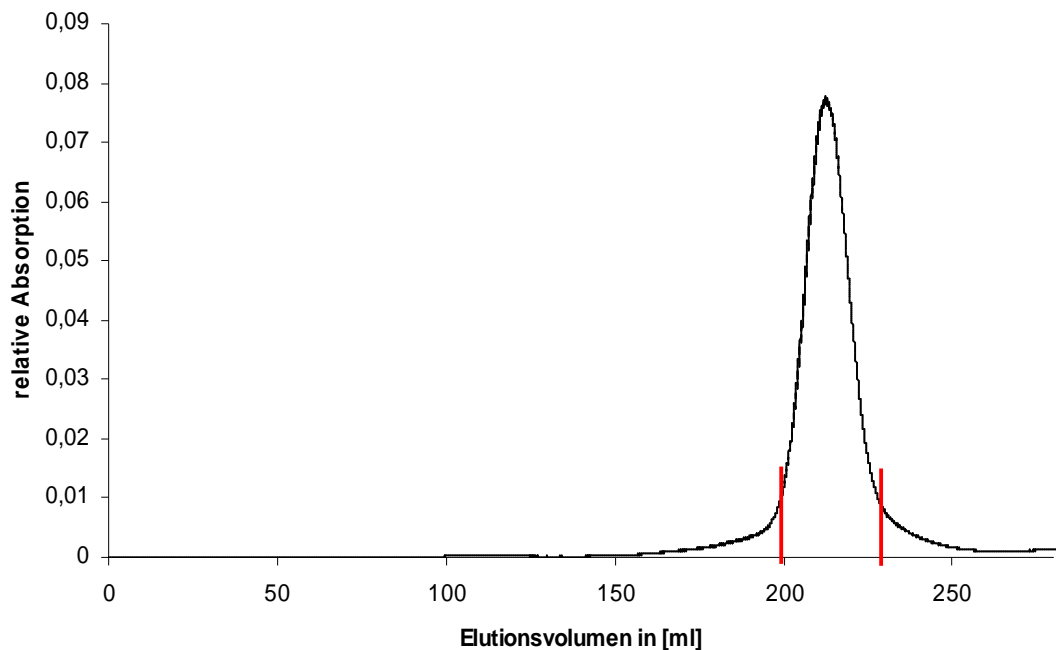
**Abb. 38: UV/VIS-Absorptionsspektren von gereinigtem FnrCCCC nach unterschiedlicher Proteinproduktion. Dargestellt ist das FnrCCCC (schwarzer Graph) und das Fnr FnrCCCC nach optimierter Proteinproduktion (roter Graph).**

Dieses so produzierte und gereinigte FnrCCCC zeigte eine deutlich höhere Absorption bei 420 nm. Der Quotient  $A_{420\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  erreichte einen Wert

von 0,24 und der Eisengehalt stieg von 2 Mol auf 3 Mol Eisen pro Mol Monomer FnrCCCC. Die Ergebnisse der UV/VIS-Absorptionsspektroskopie (Abb. 38) und der Bestimmung des Eisengehalts zeigen, dass anaerob präpariertes FnrCCCC aus *G. stearothermophilus*, wie das Fnr aus *B. subtilis* ebenfalls ein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum koordiniert.

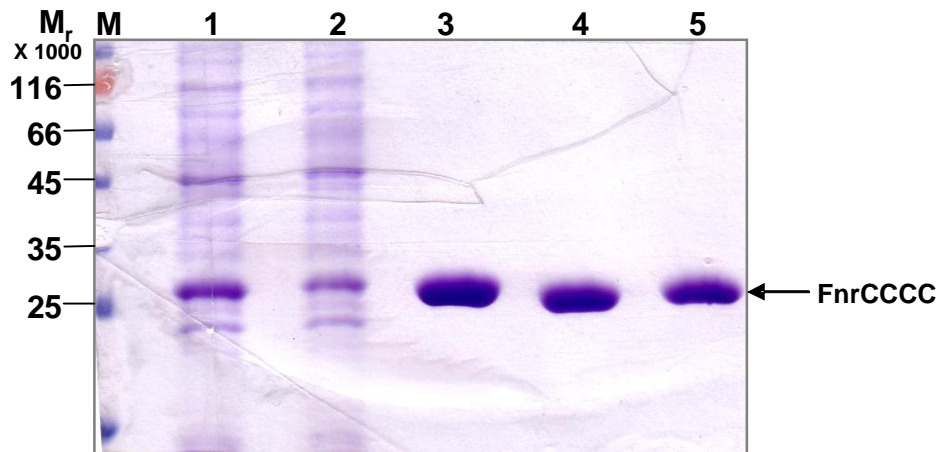
Durch diese optimierte Proteinproduktion konnte eine Verbesserung der Rekonstitution des Kofaktors erzielt werden. Es konnte eine Ausbeute von 15 mg Protein pro Liter Kultur erreicht werden.

Um das FnrCCCC ohne Affinitätstag zu kristallisieren, wurde der Strep-Tag des gereinigten Proteins mit 10 Units HRV 3C Protease (Novagen) pro mg Protein bei 25 °C und 16 Stunden nach Herstellerangaben abgespalten. Die Protease konnte über ihren 6xHistidin-Tag anschließend über eine Nickelsäule abgetrennt werden. Das Proteingemisch wurde anschließend gegen einen der für die spätere Kristallisation zu nutzenden Puffer dialysiert, die sich in Molarität und Salzgehalt unterschieden. Um den abgespaltenen Strep-Tag sowie ungeschnittenes Fusionsprotein abzutrennen, wurde diese Proteinlösung nach der Dialyse nochmals über eine Strep-Tactin-Säule gegeben. Die Proteinlösung wurde nach der zweiten Reinigung über Ultrafiltration konzentriert und in einem weiteren Schritt anaerob über eine präparative Gelpermeationschromatographie gereinigt. Für diese präparative GPC wurde hier eine HiLoad Superdex 200 Säule (26/60 prep grade von Amersham Biosciences) mit einem Säulenvolumen von 320 ml verwendet.



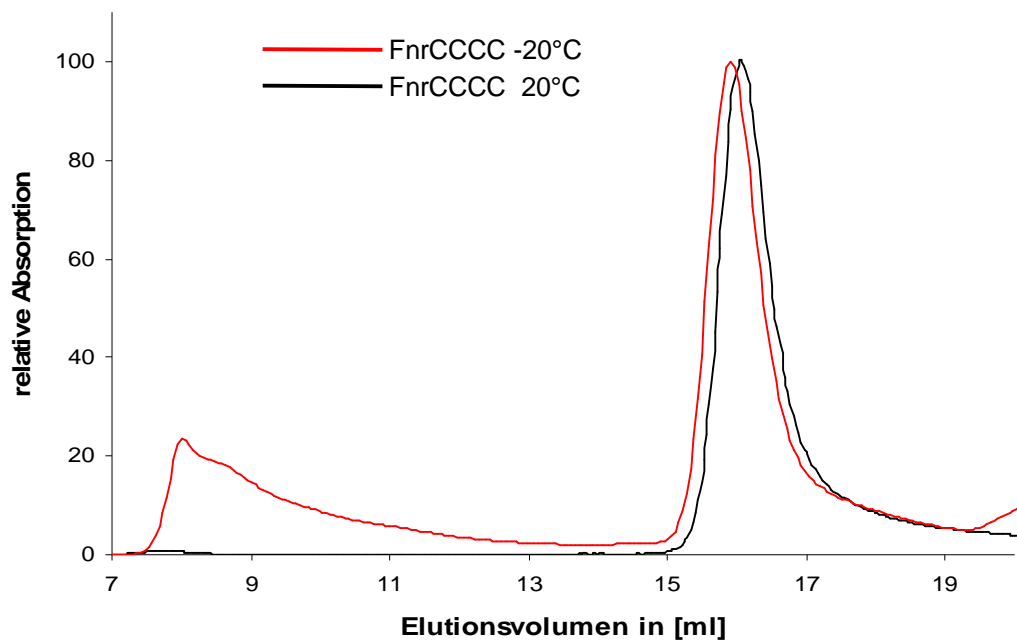
**Abb. 39: Präparative anaerobe GPC von FnrCCCC für die Kristallisation.** Der schwarze Graph zeigt die Elution des FnrCCCC. Die roten Balken zeigen den Bereich der aufgefangenen Elutionsfraktion. Das FnrCCCC eluierte in einem Bereich von 200-230 ml.

Das FnrCCCC eluierte zwischen 200 und 230 ml (Abb. 39). Die GPC zeigte nur einen Peak, was auf eine hohe Reinheit der FnrCCCC Proteinfraktionen hinweist. Die Fraktionen wurden separat gesammelt und anschließend durch Ultrafiltration auf 10 mg/ml konzentriert. Der Erfolg der Reinigung wurde über eine SDS-PAGE visualisiert (Abb. 40). Im Durchfluss sowie in der Waschfraktion der Strep-Tactin-Säule ist eine Bande bei 28,4 kDa zu sehen, welche dem FnrCCCC-Strep-Tag entspricht. Dies ist dadurch erklärbar, dass die Strep-Tactin-Säule gesättigt war und so nicht das gesamte Fusionsprotein binden konnte (Abb. 40, Spur 1 und 2). Das gereinigte FnrCCCC mit einer Größe von 28,4 kDa zeigte keine weiteren Verunreinigungen (Abb. 40, Spur 3). Die Spaltung des Strep-Tags von dem Fusionsprotein mit der HRV 3C Protease war erfolgreich, die Größe des FnrCCCC verringerte sich um 2,4 kDa (Abb. 40, Spur 4). Nach finaler Reinigung über eine präparative GPC wurden die Elutionsfraktionen vereinigt und erneut über Ultrafiltration auf 10 mg/ml konzentriert. In der SDS-PAGE waren keine Verunreinigungen oder proteolytischen Abbauprodukte zu erkennen (Abb. 40, Spur 5).



**Abb. 40: Reinigung des *G. stearothermophilus* FnrCCCC.** Gezeigt ist der Durchfluss des Proteingemischs aus *E. coli* mit überproduziertem FnrCCCC nach Auftragen auf die Strep-Tactin Säule (Spur 1). (Spur 2) zeigt die Fraktion des Waschschritts der Reinigung, (Spur 3) gereinigtes FnrCCCC, (Spur 4) das gereinigte FnrCCCC nach Entfernen des Strep-Tags mit der HRV 3C Protease und (Spur 5) das über die GPC gereinigte und durch Ultrafiltration auf 10 mg/ml aufkonzentrierte FnrCCCC, das für die Kristallisation genutzt wurde. (Spur M) zeigt die Trennung von Markerproteinen (Prestained ProteinLadder, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Die relative molekulare Masse der Markerproteine ist angegeben. Gereinigtes Fnr und Proteine der cytoplasmatischen Fraktion wurden nach Zugabe von SDS-PAGE-Probenpuffer 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und durch 13,2%iges SDS-PAGE getrennt. Durch eine Coomassie Brilliant Blau-Färbung konnten die Proteine visualisiert werden.

Um die optimale Lagerung für das FnrCCCC aus dem thermophilen Organismus *G. stearothermophilus* zu bestimmen, wurde eine Probe in einer Anaerobenflasche bei -20 °C und eine weitere Probe bei 20 °C unter anaeroben Bedingungen gelagert. Nach 14 Tagen wurden diese Proben über eine analytische GPC, wie in Kap. 3.9.16 beschrieben, analysiert. Das FnrCCCC eluierte bei 15,9 bzw. 16,0 ml, was einer Größe von 45 kDa entspricht (Abb. 41). Die Größe entspricht der dimeren Form des FnrCCCC, so wie es zuvor für das Fnr aus *B. subtilis* gezeigt worden ist (Reents *et al.*, 2006a). Der rote Graph in Abb. 41 gibt das Spektrum der GPC von FnrCCCC, welches 14 Tage bei -20 °C unter anaeroben Bedingungen gelagert wurde. Es findet sich ebenso ein Peak bei 15,9 ml, sowie ein weiterer breiter Peak zwischen 8 und 11 ml (Abb. 41). Der schwarze Graph zeigt das Spektrum des FnrCCCC nach 14 tägiger Inkubation bei 20 °C unter anaeroben Bedingungen. Das Spektrum zeigt nur einen Peak der bei 16 ml detektiert wird (Abb. 41).



**Abb. 41: Analytische GPC nach unterschiedlichen Lagerungstemperaturen des FnrCCCC.** FnrCCCC nach 14 tägiger anaerober Inkubation bei -20 °C (roter Graph), FnrCCCC nach 14 tägiger Inkubation bei 20 °C unter anaeroben Bedingungen (schwarzer Graph).

Durch die Lagerung bei -20 °C bilden sich Aggregate, was durch den breiten Peak zwischen 8 und 11 ml zu beobachten ist (Abb. 41). Die optimale Lagerungstemperatur für das FnrCCCC liegt daher bei 20 °C unter anaeroben Bedingungen. Die Lagerung über 14 Tage bei RT ohne Aggregatbildung und Proteolyse zeigt im Vergleich zum Fnr aus *B. subtilis* eine erheblich höhere Stabilität des Proteins aus dem thermophilen Organismus.

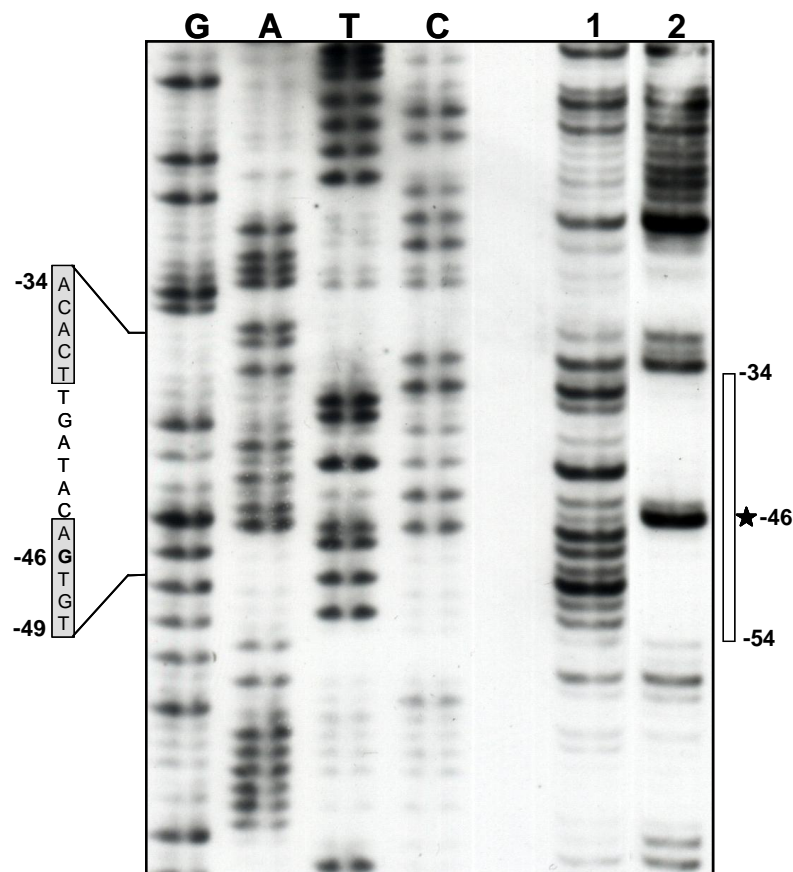
#### 4.2.3 Das FnrCCCC aus *Geobacillus stearothermophilus* bindet an den *narG*-Promotor aus *Bacillus subtilis*.

Nach einer Vorhersage der Sekundärstruktur des Fnr aus *G. stearothermophilus* enthält es vergleichbar zum Fnr aus *B. subtilis* in der C-terminalen Domäne des Proteins ein Helix-Turn-Helix-Motiv. Dieses Motiv wird durch die  $\alpha$ E und  $\alpha$ F-Helices ausgebildet. Die Aminosäurereste Arg189 und Glu190, welche im Fnr aus *B. subtilis* für die Bindung an die DNA benötigt werden, sind im Fnr aus *G. stearothermophilus* als Arg180 und Glu181 konserviert (Kap. 4.1.2, Abb. 16). Um die Bindung an die DNA des FnrCCCC aus *G. stearothermophilus* *in vitro* zu untersuchen, wurden DNaseI Footprint

Analysen durchgeführt. Für die DNaseI Footprint Analyse wurde mittels PCR ein 310 bp langes *narG*-Promotorfragment aus *B. subtilis* (-200 bis +110 relativ zum Transkriptionsstartpunkt) durch einen 5'-Digoxigenin modifizierten Primer EH176Dig und einen nicht markierten Primer EH177 amplifiziert. In dem Promotorfragment ist die palindromische Sequenz der *B. subtilis* Fnr Bindesequenz 5'-TGTGA-N<sub>6</sub>-TCACA-3' enthalten. 35 ng des gereinigten Fragments wurden unter anaeroben Bedingungen ohne bzw. mit 1,6 µM anaerob gereinigtem FnrCCCC inkubiert und anschließend mit DNaseI behandelt. Die DNA-Fragmente wurden nach der DNaseI Spaltung elektrophoretisch getrennt und nach Transfer auf eine positiv geladene Nylonmembran detektiert.

Zur genauen Ermittlung der Footprintbereiche wurden parallel auf dem Gel Sequenzierungsansätze des *narG*-Promotorfragments mit dem EH176Dig aufgetragen (Abb. 42, Spur G, A, T und C).

Vergleicht man das Spaltungsmuster des kodierenden Strangs ohne Zugabe von FnrCCCC (Abb. 42, Spur 1) und mit FnrCCCC (Abb. 42, Spur 2), so sieht man deutlich einen Bereich in welchem DNA Fragmente fehlen (Abb. 42, Spur 2). Wie auch schon für das Fnr aus *B. subtilis* beschrieben, zeigt sich für das FnrCCCC aus *G. stearothermophilus* außerdem bei -46 relativ zum Transkriptionsstartpunkt ein DNaseI hypersensitiver Bereich (Abb. 42, Spur 2). Die hypersensitive Stelle liegt mittig in dem geschützten Bereich von -34 bis -54 relativ zum Transkriptionsstartpunkt. Dieser geschützte Bereich liegt genau in dem Bereich der Bindungssequenz des Fnr aus *B. subtilis*. Somit konnte gezeigt werden, dass das gereinigte FnrCCCC von *G. stearothermophilus* an die Fnr-Bindungssequenz bindet.

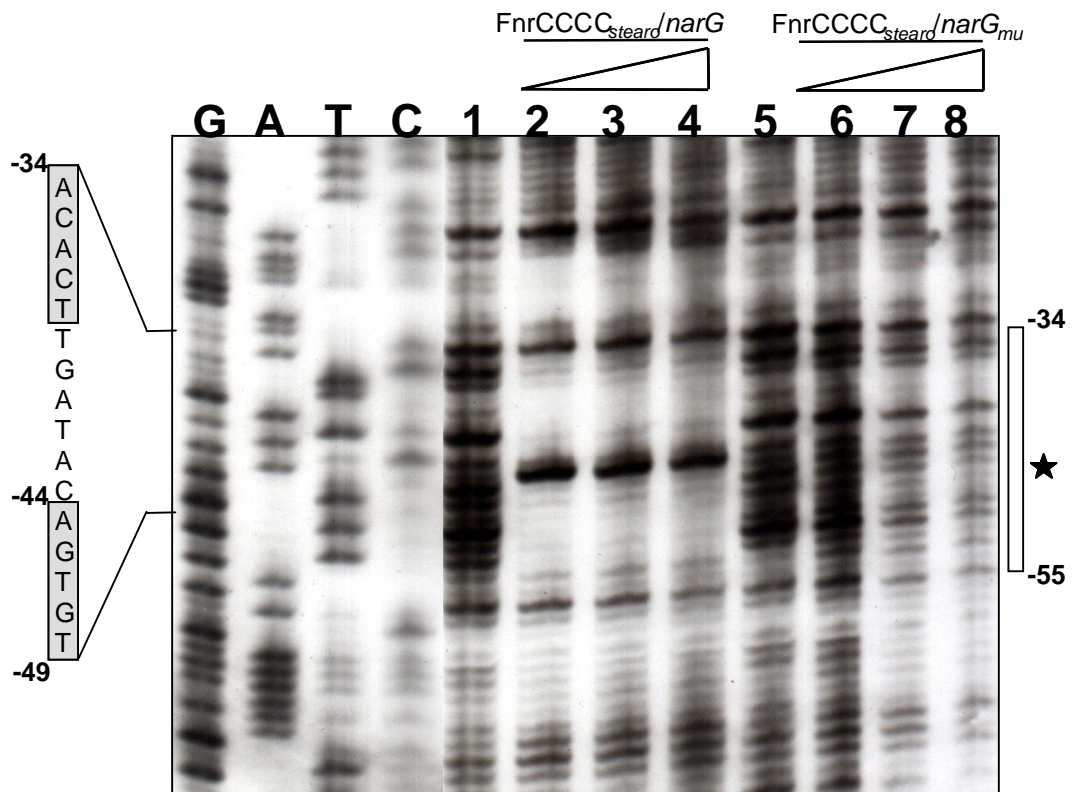


**Abb. 42: DNaseI Footprint Analysen.** Hierfür wurde anaerob gereinigtes FnrCCCC aus *G. stearothermophilus* in einer Konzentration von 1,6  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Ein DNA-Fragment, welches die Promotorregion mit Fnr-Bindestelle aus *B. subtilis* des *narG*176 kodierenden Strang repräsentiert, wurde eingesetzt. Als Vergleich ist eine Sequenzierreaktion des *narG*-Fragments aufgetragen (Spur G, A, T und C). (1) ohne Protein, (2) FnrCCCC. Der Footprint ist durch einen weißen Balken markiert, die hypersensitive Stelle mit einem Stern. Die Bindestelle mit der Sequenz ist hervorgehoben.

Um die Spezifität der Bindung des FnrCCCC aus *G. stearothermophilus* an die Fnr-Bindestelle zu untersuchen, wurde ein mutiertes *narG*-Fragment eingesetzt. Die Mutation wurde in der stromabwärtsgelegenen Halbseite der palindromischen Sequenz 5'-TGTGTA-3' zu 5'-CCTGTA-3' eingebracht. Für das FnrCCCC aus *G. stearothermophilus* wurde mit diesem mutierten *narG*-Fragment eine DNaseI Footprint Analyse durchgeführt (Abb. 43, Spur 5 bis 8). Im Vergleich dazu ist in Spur 1 bis 4 die Footprint Analyse mit nicht mutiertem *narG*-Fragment aufgetragen (Abb. 43). Es wurden 3 verschiedene Proteinkonzentrationen 0,5, 1 und 1,9  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Das FnrCCCC aus *G. stearothermophilus* zeigt mit nicht mutiertem Fragment einen geschützten Bereich der DNA und die Bildung einer hypersensitiven Stelle (Abb. 43, Spur 2-4). Die drei verschiedenen Proteinkonzentrationen zeigen keinen



Unterschied im Bindeverhalten. Die Footprint-Analyse mit dem mutierten *narG*-Fragment zeigt keinen geschützten Bereich. Eine hypersensitive Stelle ist nicht detektierbar (Abb. 43, Spur 6-8). Dies zeigt eine spezifische Bindung des FnrCCCC aus *G. stearothermophilus* an die Fnr-Bindestelle. Die Spezifität für die palindromische Sequenz ist durch die Mutation aufgehoben, so dass keine Bindung an die DNA mehr stattfinden kann.



**Abb. 43: DNase I Footprint Analysen.** Hierfür wurde das anaerob gereinigte FnrCCCC aus *G. stearothermophilus* in einer Konzentration von 0,5, 1 und 1,9  $\mu$ M eingesetzt. Zwei DNA-Fragment wurde eingesetzt, welche die Promotorregion mit Fnr-Bindestelle und mit mutierter Fnr-Bindestelle des *narG*176 kodierenden Strang repräsentieren. (1-4) FnrCCCC aus *G. stearothermophilus* mit *narG*-Fragment. (1) ohne Protein, (2) 0,5  $\mu$ M FnrCCCC, (3) 1  $\mu$ M FnrCCCC, (4) 1,9  $\mu$ M FnrCCCC. (5-8) FnrCCCC aus *G. stearothermophilus* mit mutiertem *narG<sub>mu</sub>*-Fragment (5) ohne Protein, (6) 0,5  $\mu$ M FnrCCCC, (7) 1  $\mu$ M FnrCCCC, (8) 1,5  $\mu$ M FnrCCCC. Der Footprint ist durch einen weißen Balken markiert, die hypersensitive Stelle mit einem Stern. Die Bindestelle mit der Sequenz ist hervorgehoben.

Das FnrCCCC aus *G. stearothermophilus* konnte *in vivo* einen *B. subtilis* *fnr*-Knock-out Stamm komplementieren. Auch *in vitro* zeigt sich ein mit dem Fnr aus *B. subtilis* vergleichbares Bindeverhalten. Das FnrCCCC aus *G. stearothermophilus* schützt in den DNase I Footprint Analysen den gleichen Bereich wie es zuvor für das Fnr aus *B. subtilis* gezeigt worden ist. Auch die hypersensitive Stelle konnte detektiert werden (Abb. 42). Mutationen im Bereich



der palindromischen Sequenz führen zu einem Verlust der Spezifität der Bindung (Abb. 43 Spur 6-8). Diese Ergebnisse lassen auf einen vergleichbaren Mechanismus der DNA-Bindung zwischen dem Fnr aus *B. subtilis* und dem Fnr aus *G. stearothermophilus* schließen.

#### **4.2.4 Experimente zur Kristallisation des *Geobacillus stearothermophilus* Fnr**

Für das Fnr aus *G. stearothermophilus* konnte gezeigt werden, dass es in wesentlichen Eigenschaften dem Fnr aus *B. subtilis* gleicht. Es liegt als Dimer vor, koordiniert unter anaeroben Bedingungen ebenfalls ein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum als Kofaktor und bindet die gleiche DNA-Sequenz. Es konnte im großen Maßstab produziert und gereinigt werden und zeigte eine hohe Stabilität bei 20 °C unter anaeroben Bedingungen. Mit diesem Protein wurden nun Kristallisationsexperimente zur Strukturaufklärung angefertigt.

Für den Versuch wurde das FnrCCCC in Konzentrationen von 5-10 mg/ml in verschiedenen Kristallisationspuffern eingesetzt. Die Tris-HCl-Konzentration (pH = 8) des Puffers variierte zwischen 25 und 50 mM. NaCl wurde in den Konzentrationen 75 und 100 mM eingesetzt, 5 mM DTT wurden konstant zu jedem Puffer hinzugefügt. Ein weitere Puffer bestand aus 25 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM DTT (pH 8).

Für die Kristallisation wurde sowohl die „sitting drops“ als auch die „hanging drops“ Methode verwendet. Für die „sitting drops“ Methode wurden 96 Well Platten verwendet. Das Reservoir wurde mit 90 µl Kristallisationspuffer befüllt und 1 µl FnrCCCC mit 1 µl Puffer vermischt. Für die hanging drops Methode wurden 24 Well Platten gewählt. Das Reservoir wurde mit 500 µl Kristallisationspuffer befüllt. 1-3 µl Protein mit einer Konzentration von 10 mg/ml wurden mit 3-1 µl Kristallisationspuffer vermischt, so dass die Tropfen ein Volumen von 4 µl erreichten.

Für die Kristallisation wurden die Screens von Nextal (Quiagen GmbH, Deutschland) eingesetzt: EasyXtal Classics Lite Suite, EasyXtal Classics Suite, EasyXtal Classics II Suite, EasyXtal Cryos Suites, EasyXtal ComPas Suite, EasyXtal JCSG Core Suite I, EasyXtal JCSG Core Suite II, EasyXtal JCSG Core Suite III, EasyXtal JCSG Core Suite IV, EasyXtal JCSG+ Suite, EasyXtal

MbClass II Suites, EasyXtal MPD Suite, EasyXtal PACT Suite, EasyXtal PEGs Suite.

Die Kristallisationsansätze wurden bei 17 °C in einer Anaerobenbox inkubiert. Ebenfalls wurden Kristallisationsexperimente unter aeroben Bedingungen mit dem EasyXtal Classics Lite Suite durchgeführt. Der Kristallisationserfolg wurde erstmals nach 3 Tagen, dann wöchentlich überprüft.

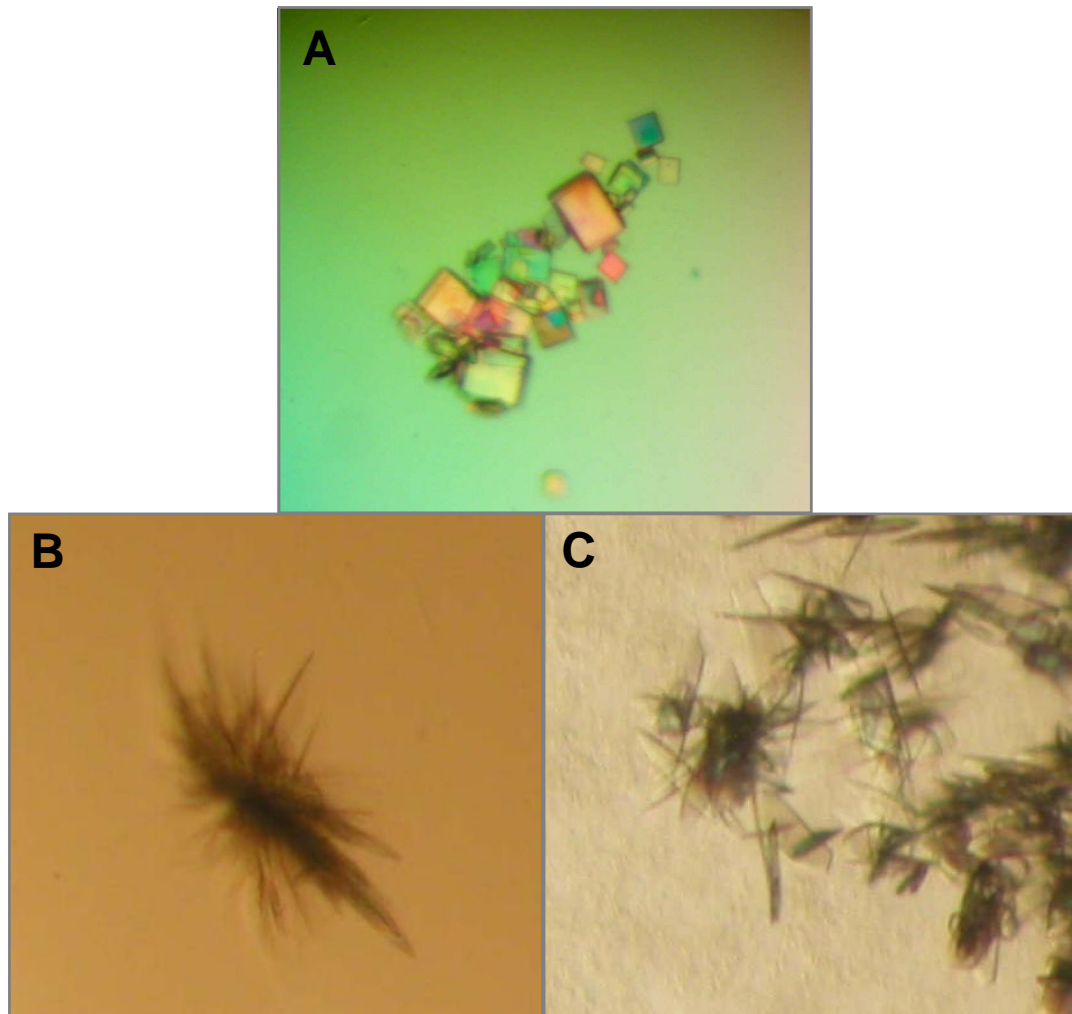
Für drei Bedingungen wurden Nadelstrukturen oder Kristalle beobachtet, woraufhin Verfeinerungen angesetzt wurden.

Für die Bedingung EasyXtal MbClass II Suites Bedingung Nr. 17 (0,1 M Tri-Natriumcitrat pH 5,6, 1 M Magnesiumsulfat), wurden polarisierende Kristalle gefunden (Abb. 44 A). Zur Verfeinerung dieser Bedingung wurde sowohl der pH Wert schrittweise auf 5, 5,3, 5,6, 5,9, 6,2 und 6,5 geändert, als auch in Kombination die Magnesiumsulfat Konzentration von 0,8, 1, 1,2, und 1,4 M variiert. Die im Vorfeld detektierten Kristalle konnten aus technischen Gründen nicht vermessen werden (Abb. 44 A). Aus der Verfeinerung sind keine weiteren Kristalle hervorgegangen. So konnte nicht geklärt werden, ob es sich im ersten Versuch um Protein-, oder Salzkristalle handelte.

Für die Bedingung EasyXtal Classics Suite Bedingung Nr. 48 (4 M Natriumformiat) konnten Nadelstrukturen beobachtet werden (Abb. 44 B). Für die Verfeinerung wurde der pH Wert auf 7,4, 7,9, 8,4, 8,9, 9,4 und 9,9 verändert und in Kombination mit einer variierten Natriumformiatkonzentration von 3,6, 4, 4,4, 4,8 und 5 M eingesetzt. Für die Bedingungen 3,6 M Natriumformiat pH 7,4 und 4,4 M Natriumformiat pH 7,4 wurde zusätzlich ein Detergent Screen 1™ und Additive Screen HT™ (Hampton Research, Aliso Viejo Kalifornien) angesetzt. Mit der Bedingung 3,6 M Natriumformiat pH 7,4 mit 1 µl 1,8-Amino-octane (Additive Screen HT™) konnten die besten Ergebnisse erzielt werden. Die Nadelstruktur veränderte sich zu kristallinen Plättchen (Abb. 44, C), aus denen jedoch keine messbaren Kristalle hervorgingen. Da die kristallinen Plättchen braun gefärbt waren, kann angenommen werden, dass es sich um Fnr handelte. Da eine Fnr-Proteinlösung unter anaeroben Bedingungen, bedingt durch den Kofaktor, eine braune Färbung zeigt.

Für die Bedingung EasyXtal JCSG Core Suite II Bedingung Nr. 33 (1 M Lithiumchlorid, 0,1 M HEPES pH 7, 10 % (w/v) PEG 6000) wurden ebenfalls Nadelstrukturen beobachtet. Für die Verfeinerung wurde der pH Wert

auf 5, 6,5, 7 und 7 variiert und in Kombination mit einer veränderten PEG 6000 Konzentration von 15, 17,5, 20, 22,5, 25 und 30 % getestet. Das Protein wurde mit Konzentrationen von 5, 10, 50 und 100 mg/ml eingesetzt. Die Nadelstrukturen waren reproduzierbar. Es konnte durch diese Veränderungen jedoch keine Optimierung der Nadelstruktur erreicht werden (Abb. 44 C)



**Abb. 44: Kristallisationsergebnisse mit dem FnrCCCC aus *G. stearothermophilus*.** (A) Kristalle mit der Bedingung MbClass II Suites Nr. 17 (0,1 M Tri-Natriumcitrat pH 5,6, 1 M Magnesiumsulfat), (B) Nadelstrukturen mit der Bedingung EasyXtal Classics Suite Nr. 48 (4 M Natriumformiat), (C) Verfeinerung aus 4 M Natriumformiat, mit dem Additivscreen, 4  $\mu$ l FnrCCCC, 5 $\mu$ l 3,6 M Natriumformiat pH 7,4, 1 $\mu$ l 1,8-Amino-octane

Mit den bisher durchgeführten Kristallisationsansätzen konnten keine messbaren Kristalle für die Strukturaufklärung gewonnen werden. Weitere Ansätze sind daher nötig, um die Pufferbedingungen weiter zu optimieren.

Für den aktiven Zustand des FnrS wurden Konformationsänderungen im Protein postuliert, die eine Bindung des Regulators ermöglichen (Reents *et al.*, 2006a).

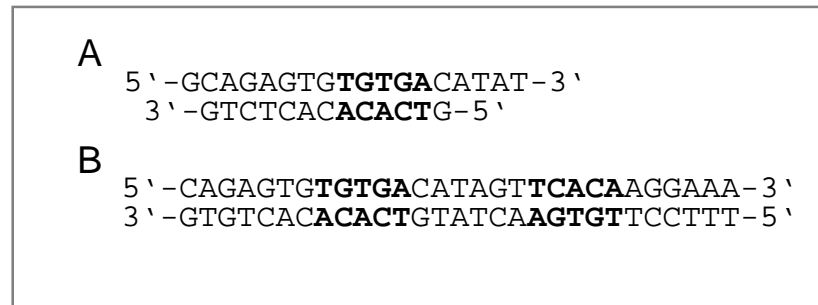
Eine Möglichkeit um die Proteinstruktur im aktiven Zustand zu stabilisieren könnte die Kristallisation von Fnr gemeinsam mit DNA sein.

#### **4.2.5 Experimente zur Kokristallisation von FnrCCCC-DNA-Komplexen**

In der Kristallstruktur des PrfA Wildtypprotein aus *L. monocytogenes* konnte für das Helix-Turn-Helix-Motiv keine Elektronendichte gemessen werden, was auf eine sehr flexible Struktur hinweist. Dieses Motiv konnte erst bei Strukturaufklärung einer konstitutiv aktiven Mutante analysiert werden (Eiting *et al.*, 2005). Es ist anzunehmen, dass dieses Struktur-Motiv im Fnr aus *G. stearothermophilus* ebenfalls variabel ist. Eine Kristallisation des Fnr Regulators, gebunden an DNA, könnte zur Stabilität des aktiven Zustands führen. Erste Strukturen des Crp aus *E. coli* konnten schon 1991 zusammen mit spezifischer DNA gelöst werden (Schultz *et al.*, 1991). Da Crp aus *E. coli* die gleiche palindromische Bindesequenz erkennt wie das Fnr aus *B. subtilis*, wurde eine Protein/DNA-Kokristallisation durchgeführt. In dieser Arbeit konnte mit *in vitro* Bindungsstudien gezeigt werden, dass das Fnr aus *G. stearothermophilus* die palindromische Bindesequenz des Fnr aus *B. subtilis* erkennt und daran bindet (Abb. 42).

Zur Kokristallisation von Crp aus *E. coli* mit DNA wurden sehr viele unterschiedliche DNA-Fragmente getestet (Schultz *et al.*, 1991). Kristalle wurden zum Einen mit einem DNA-Fragment erhalten, welches nur eine Halbseite der Erkennungssequenz beinhaltet und zum Anderen mit einem 29 bp langen DNA-Fragment, das die gesamte Erkennungssequenz beinhaltet (Schultz *et al.*, 1991). Da FnrCCCC an die gleiche Erkennungssequenz binden kann, wurden vergleichbare DNA-Fragmente aus dem *narG*-Promotor synthetisiert.

Erstens Nukleotidsequenzen die nur eine Halbseite der palindromischen Sequenz mit einer Länge von 13 bzw. 18 bp tragen und überhängende Nukleotide zeigen (13/18) (Abb. 45, A). Zweitens Nukleotidsequenzen mit beiden Halbseiten der palindromischen Sequenz mit einer Länge von 29 bp ohne überhängende Nukleotide (29/29) (Abb. 45, B).



**Abb. 45: Eingesetzte DNA Sequenzen für die Kristallisationsexperimente mit dem FnrCCCC.** (A) Nukleotidsequenzen übereinstimmend mit einer Halbseite der palindromischen Sequenz aus dem *narG*-Promotor, mit einer Länge von 13 bzw. 18 bp und überhängenden Nukleotiden. (B) Nukleotidsequenz des *narG*-Promotors mit beiden Halbseiten der palindromischen Sequenz des FnrS, mit einer Länge von 29 bp.

Die synthetisierten einzelsträngigen Oligonukleotide wurden über einen Temperaturgradienten hybridisiert. Der Erfolg wurde über eine 20 % Polyacrylamid-PAGE kontrolliert.

Das FnrCCCC wurde für die Kokristallisation in einer Konzentration von 8 mg/ml eingesetzt, während die Oligonukleotide mit einem 1,5 M Überschuss hinzugegeben wurden. Das Gemisch wurde 30 min inkubiert, um die Bindung zu ermöglichen. Für die Kokristallisation wurde der Screen EasyXtal Nucleix Suite, welcher speziell für die Kristallisation von Protein-DNA-Komplexen entwickelt worden ist, eingesetzt. Die Kristallisationsexperimente wurden nach der Sitting drop Methode durchgeführt, wobei 1 µl des Protein-DNA-Gemischs mit 13/18 bp oder 29/29 bp mit 1 µl Kristallisationspuffer vermengt wurde. Das Reservoir wurde mit 90 µl Kristallisationspuffer befüllt. Der Erfolg der Kristallisation wurde nach 3 Tagen und danach wöchentlich überprüft. In keiner der untersuchten Bedingungen konnte eine Kristallbildung beobachtet werden. Um für das FnrCCCC das individuell passende DNA-Fragment zu finden, muss für die Kristallisation eine größere Vielfalt von synthetisierten DNA-Fragmenten getestet werden.

### 4.3 Untersuchung der Regulation Fnr-abhängiger Gene in *Bacillus subtilis* in vivo

*B. subtilis* als fakultativ anaerober Mikroorganismus kann über eine Regulationskaskade eine schnelle Adaption an anaerobe Umweltbedingungen durchführen. Die Genexpression des anaeroben Regulators Fnr aus *B. subtilis*, wird als Antwort auf den Sauerstoffmangel über das Zweikomponentensystem ResDE induziert. Das Regulon des Fnr aus *B. subtilis* beinhaltet 4 Gengruppen verschieden regulierter Gene (Reents *et al.*, 2006b). Die Expression von Genen der Gengruppe 1 des Fnr Regulons wird direkt über Fnr anaerob aktiviert. Dazu gehören das *narGHJI*-Operon, das *narK*-Gen und das *arfM*-Gen. Die Fnr Bindesequenz befindet sich an Position -40,5 bzw. -41,5 relativ zum Transkriptionsstartpunkt (Marino *et al.*, 2001).

Zu den Genen der Gengruppe 2 des Fnr Regulons gehören das *ldhIctP*-Operon, *alsSD* und *ywcJ*. Die Gene der Gengruppe 2 werden indirekt über Fnr reguliert, da ihre Expression abhängig vom Vorhandensein der funktionellen Nitratreduktase in der Zelle ist. Sie besitzen in ihrer Promotorregion eine hochkonservierte nicht funktionelle Fnr-Bindestelle, die mit einer Rex-Bindestelle überlappt. Wobei Rex abhängig vom NADH/NAD<sup>+</sup> Quotienten die Expression der Gene der Gengruppe 2 unter nicht fermentativen Bedingungen reprimiert.

#### 4.3.1 Footprint-Analysen mit dem Fnr aus *B. subtilis* für die Promotoren der Gene der Gengruppe 1 und 2 des Fnr Regulons

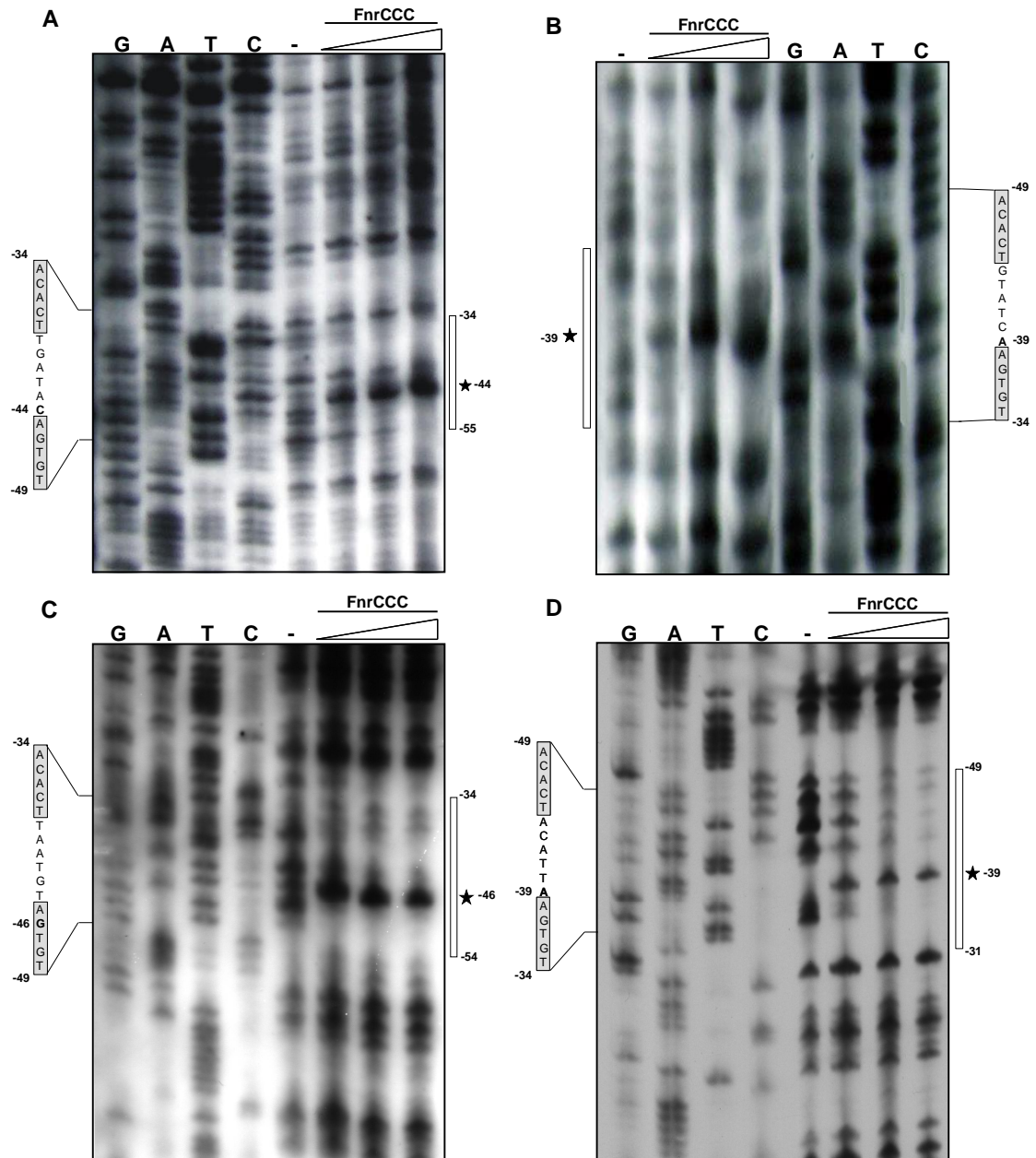
Es stellt sich nun die Frage, warum die Fnr-Bindestellen in den Promotoren von *ldhIctP*, *alsSD* und *ywcJ* nicht funktionell sind. Es stellte sich die Frage, ob Fnr an diese Erkennungssequenz nicht binden kann.

Um die Bindung von Fnr in den Promotorbereichen von *narGHJI*, *narK*, *ldhIctP*, *alsSD* und *ywcJ* *in vitro* zu untersuchen, wurden DNaseI Footprint Analysen durchgeführt. Für die Gene der Gengruppe 1 wurde für diese Untersuchung das 310 bp lange *narG*-Promotorfragment (-200 bis +110 relativ zum Transkriptionsstartpunkt) und ein 234 bp langes *narK*-Promotorfragment (-140 bis +94 relativ zum Transkriptionsstartpunkt) aus *B. subtilis* amplifiziert. Für die Untersuchung der nicht-kodierenden Bereiche der Gene der Gengruppe 2

wurde für diese Untersuchung mittels PCR ein 300 bp langes *ldhIctP*-Promotorfragment (-147 bis +153 relativ zum Transkriptionsstartpunkt), ein 323 bp langes *alsSD*-Promotorfragment für den kodierenden Strang (-218 bis +105 relativ zum Transkriptionsstartpunkt) bzw. ein 251 bp langes für den nicht kodierenden Strang (-200 - +51 relativ zum Transkriptionsstartpunkt) sowie ein 378 bp langes *ywcJ*-Promotorfragment (-176 bis +202 relativ zum Transkriptionsstartpunkt) aus *B. subtilis* amplifiziert.

20 bis 40 ng der gereinigten Fragmente wurden unter anaeroben Bedingungen ohne Fnr bzw. mit 0,9, 1,8 oder 3,6  $\mu$ M anaerob gereinigtem FnrCCC inkubiert und anschließend mit DNaseI behandelt. Die Auftrennung der Dig-markierten DNA-Fragmente und die Detektion fanden wie in Kap. 3.9.21 beschrieben, statt. Parallel zur DNaseI Footprint Analyse wurden jeweils spezifische Sequenzierreaktionen der Promotorfragmente aufgetragen (Abb. 46, Abb. 47 Spuren G, A, T und C).

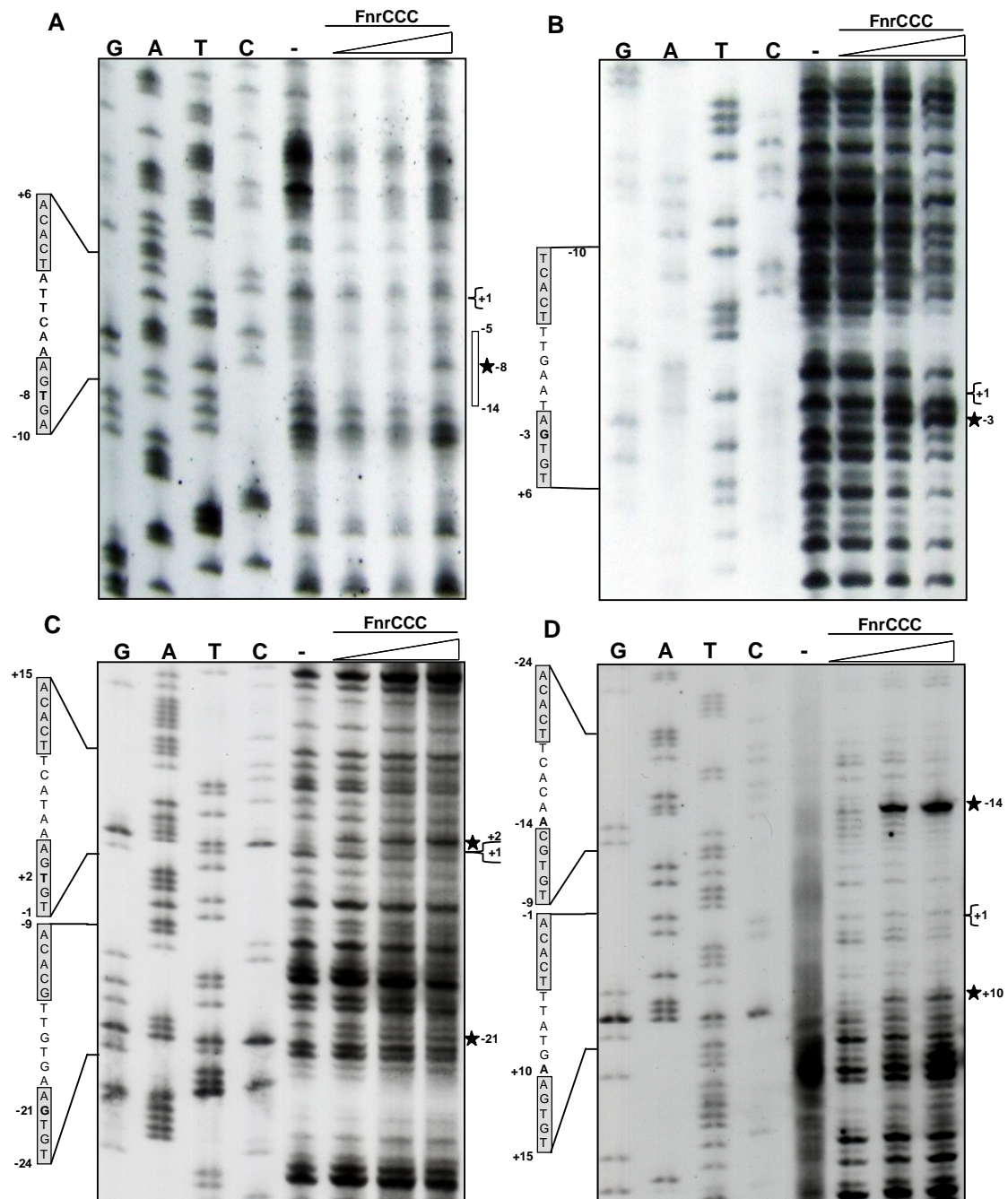
In den Spuren der Negativkontrolle ohne Fnr ist ein durchgängiges Fragmentmuster zu erkennen. Durch Zugabe des FnrCCC wird bei den Analysen des *narG*-Promotorfragments (Abb. 46 A und B), sowie des *narK*-Promotorfragments (Abb. 46 C und D) ein Bereich, der der palindromischen Fnr-Bindesequenz entspricht, ohne Spaltungsmuster sichtbar. Mit ansteigender Proteinkonzentration, wird dieser vor DNaseI geschützte Bereich deutlicher. Die Bildung der charakteristischen hypersensitiven Stelle ist auch hier zu erkennen (Abb. 46 A, B, C und D mit Stern markiert). Die Bindung des FnrCCC Proteins ist durch die *in vitro* DNaseI Footprint Analyse an dem kodierenden als auch an dem nicht-kodierenden Strang der Promotorfragmente von *narG* und *narK* nachweisbar.

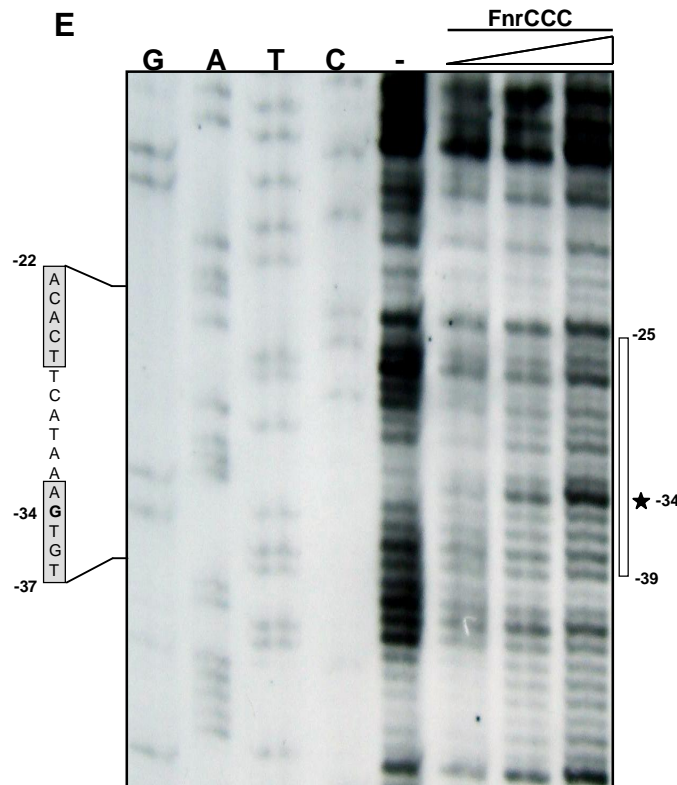


**Abb. 46: DNaseI Footprint Analysen mit FnrCCC aus *B. subtilis* und Promotorfragmenten der Gene der Gengruppe 1.** Für die DNaseI Footprint Analysen wurde anaerob gereinigtes *B. subtilis* FnrCCC in einer Konzentration von 0,9  $\mu$ M, 1,8  $\mu$ M und 3,6  $\mu$ M eingesetzt, sowie Fragmente der Promotorregionen mit den putativen Fnr-Bindestellen, der Gruppe 1-Gene (A) *narG*176 (kodierender Strang), (B) *narG*177 (nicht-kodierender Strang), (C) *narK*178 (kodierender Strang), (D) *narK*179 (nicht-kodierender Strang). Der Footprint ist durch einen weißen Balken markiert, die hypersensitive Stelle mit einem Stern. Die palindromische Sequenz ist gekennzeichnet.

Werden nun DNaseI Footprint Analysen unter den selben Bedingungen mit den Promotorfragmenten der Gene der Gengruppe 2, *alsSD*, *ldhIctP* und *ywcJ*, durchgeführt, so ist die charakteristische DNaseI hypersensitive Stelle sowohl bei der Analyse des kodierenden als auch des nicht-kodierenden Strang deutlich zu erkennen (Abb. 47, A bis E mit Stern markiert).







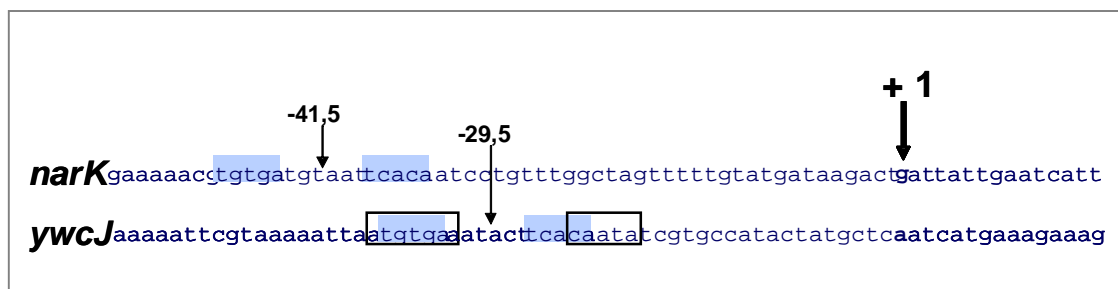
**Abb. 47: DNaseI Footprint Analysen mit FnrCCC aus *B. subtilis* und Promotorfragmenten der Gene der Gengruppe 2.** Für die DNaseI Footprint Untersuchungen wurde anaerob gereinigtes *B. subtilis* FnrCCC in einer Konzentration von 0,9  $\mu$ M, 1,8  $\mu$ M und 3,6  $\mu$ M eingesetzt, sowie Fragmente der Promotorregionen mit den putativen Fnr-Bindestellen, der Gruppe 2-Gene (A) *alsS234* (kodierender Strang), (B) *alsS175* (nicht-kodierender Strang), (C) *ldh180* (kodierender Strang) (D) *ldh181* (nicht-kodierender Strang), (E) *ywcJ20* (kodierender Strang) Der Footprint ist durch einen weißen Balken markiert, die hypersensitive Stelle mit einem Stern. Die Bindestelle ist mit der Sequenz hervorgehoben. Der Transkriptionsstartpunkt ist mit +1 gekennzeichnet.

In der DNaseI Footprint Analyse des *alsSD*-Promotorfragments zeigt sich die Bildung einer hypersensitiven Stelle bei -8 relativ zum Transkriptionsstartpunkt für den kodierenden Strang und bei -3 relativ zum Transkriptionsstartpunkt für den nicht-kodierenden Strang (Abb. 47 A und B). Das *ldhIctP*-Promotorfragment beinhaltet zwei putative palindromische Sequenzen. So kommt es hier zur Ausbildung von zwei hypersensitiven Stellen, welche für den kodierenden Strang bei +2 und -21 relativ zum Transkriptionsstartpunkt, und für den nicht-kodierenden Strang bei +10 und -14 relativ zum Transkriptionsstartpunkt liegen (Abb. 47 C und D). Die Footprint-Analyse des kodierenden Strangs des *ywcJ*-Promotorfragments zeigt auch hier die Bildung einer hypersensitiven Stelle an Position -34 relativ zum Transkriptionsstartpunkt (Abb. 47 E), welche mit steigender Proteinkonzentration stärker wird. Das Auftreten der

hypersensitiven Stelle weist auf eine *in vitro* Bindung des FnrS an die Promotoren von *alsS*, *ldhIctP* sowie *ywcJ* hin. Da die flankierenden Bereiche auf Höhe der Fnr-Bindesequenz jedoch kaum vor DNaseI Spaltung geschützt wurden, läßt das Ergebnis eine deutlich schwächere Bindung des FnrS vermuten (Abb. 47 A, B, C, D, E).

#### 4.3.2 *In vivo* Bindungsstudien der Regulatoren Rex und Fnr aus *Bacillus subtilis* an den *nark* und *ywcJ*-Promotor

Mit Hilfe von *in vitro* Bindungsstudien konnte sowohl die Bindung von Fnr als auch von Rex an den Promotorbereich des *ldhIctP*-Operons und des *ywcJ*-Gens gezeigt werden. In beiden Promotoren überlappen die Bindungsstellen für Fnr und Rex (Larsson *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008). Die Frage war, wie sich die Fnr-Bindestelle innerhalb des *nark*- und *ywcJ*-Promotors unterscheiden. Die Erkennungssequenz für Fnr ist in beiden Promotoren identisch, unterschiedlich ist aber die Position der Erkennungssequenz innerhalb der Promotoren. Im *nark*-Promotor befindet sich die Fnr-Erkennungssequenz an Position -41,5 relativ zum Transkriptionsstartpunkt, die putative Fnr Bindestelle im *ywcJ*-Promotor liegt bei -29,5 relativ zum Transkriptionsstartpunkt (Abb. 48). Möglicherweise ist die Lokalisation der Bindestelle innerhalb des Promotors entscheidend dafür ob Fnr als anaerober Aktivator wirken kann.



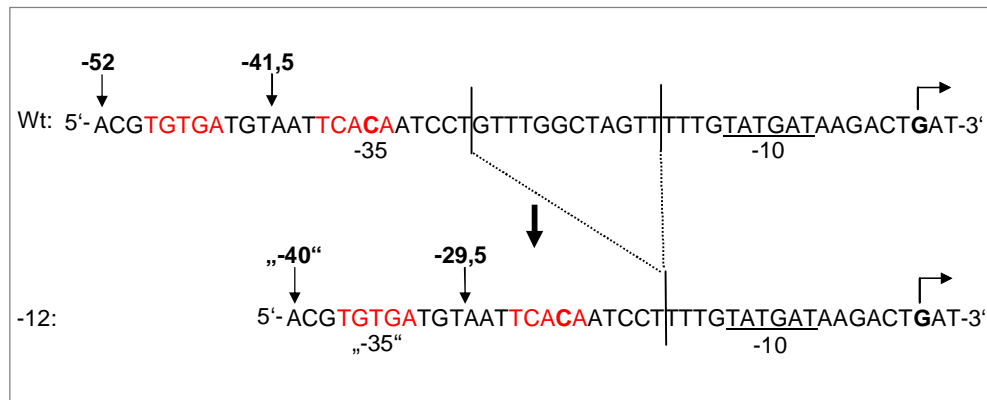
**Abb. 48: Lokalisation der Fnr- und Rex-Bindesequenz in den Promotorregionen von *nark* und *ywcJ*.** Mögliche Fnr-Bindungsstellen sind blau markiert, die Rex Bindestelle im *ywcJ*-Promotor ist schwarz umrandet. Die angegebenen Positionen beziehen sich auf den transkriptionellen Startpunkt. Der Startpunkt der Transkription ist mit fett gedruckten Buchstaben markiert.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde die potentielle Fnr-Bindestelle im *ywcJ*-Promotor durch eine Insertion von 12 Basen von Position -29,5 auf Position -41,5 relativ zum Transkriptionsstartpunkt verschoben. Als Kontrolle

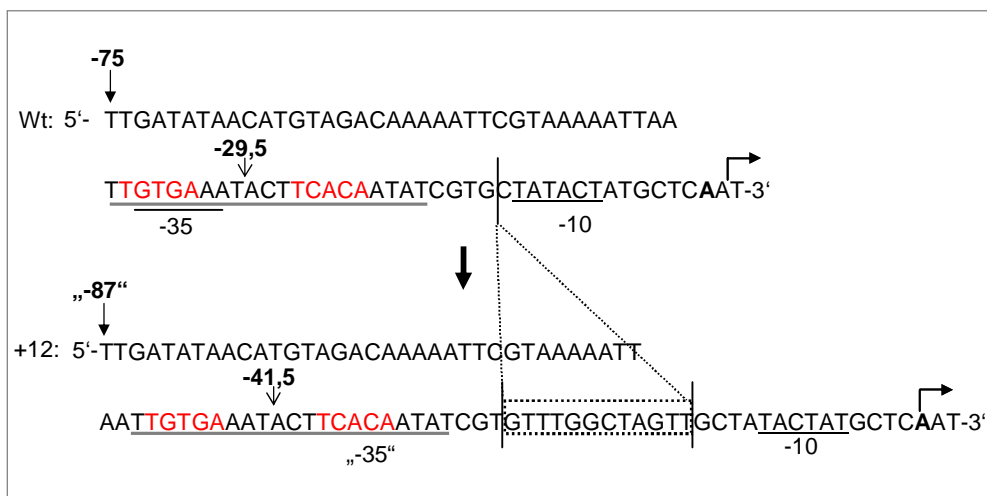
wurde die Fnr-Bindesequenz im *narK*-Promotor von der Position -41,5 auf die Position -29,5 relativ zum Transkriptionsstartpunkt verschoben. Für diesen Versuch wurden verschiedene Promotorkonstrukte generiert.

Als Kontrolle diente ein *narK*-Promotorfragment mit einer Länge von 56 Basen (-53 bis +3 relativ zum Transkriptionsstartpunkt) (Abb. 49 A, Wt). In vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass über dieses minimale Promotorkonstrukt eine Fnr-abhängige Aktivierung einer *narG-lacZ* Reporter-genfusion stattfindet (Steinmann, 2007). Das zweite Konstrukt beinhaltete das selbe *narK*-Promotorfragment mit einer Deletion von zwölf Basen von Position -17 bis -29 relativ zum Transkriptionsstartpunkt (Abb. 49 A, -12). Um das *ywcJ*-Promotorfragment zu untersuchen, wurden zwei *ywcJ*-Promotorfragmente konstruiert. Das erste beinhaltet die *ywcJ*-Promotorsequenz von Position -75 bis +3 relativ zum Transkriptionsstartpunkt (Abb. 49 B, Wt). In dieses Promotorfragment wurde eine Insertion von 12 Basen an Position -14,5 relativ zum Transkriptionsstartpunkt eingeführt, so dass die potentielle Fnr-Bindestelle nun bei -41,5 im Promotor lokalisiert ist (Abb. 49 B, +12).

A



B



**Abb. 49: Veränderte Architektur des *narK*- und *ywcJ*-Promotors.** (A) zeigt das *narK*-Wildtyp-Promotorfragment (Wt), und das veränderte Promotorfragment (-12) mit einer Deletion von 12 Basen an Position -17 bis -29 relativ zum Transkriptionsstartpunkt. (B) zeigt das *ywcJ*-Wildtyp-Promotorfragment (Wt), und das veränderte Promotorfragment (+12) mit einer Insertion von 12 Basen an Position -14,5 relativ zum Transkriptionsstartpunkt. Die Fnr-Bindestelle ist rot hervorgehoben, die überlappende Rex-Bindestelle im *ywcJ*-Promotor ist grau unterstrichen. Die Basendeletion oder -insertion ist durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Der Transkriptionsstartpunkt ist fett gedruckt und durch einen Pfeil hervorgehoben.

Die vier Promotorfragmente wurden jeweils in den Vektor pDIA5322 vor das *lacZ*-Gen kloniert. Die Aktivität der verschiedenen Promotorkonstrukte konnte so über die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Reportergenfusionen bestimmt werden. Die vier Reportergenfusionen wurden in den *B. subtilis* Wildtyp Stamm JH642 (Wt) und in die *B. subtilis* Knock-out Stämme THB2 ( $\Delta fnr$ ), MH5202 ( $\Delta resD$ ) und IGB13 ( $\Delta rex$ ) transformiert (Hoffmann *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 1996b). Die Konstrukte konnten über im Vektor vorhandene *amyE*-Fragmente in das Genom von *B. subtilis* rekombiniert werden. Die neu entstandenen Stämme wurden in SMM-Minimalmedium sowohl unter aeroben und unter

anaeroben Bedingungen mit Nitrat als auch fermentativ kultiviert. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde nach drei und sechs Stunden bestimmt. Die Versuche wurden 5-mal wiederholt. Jedoch zeigten die gemessenen absoluten Werte der einzelnen Versuche starke Abweichungen. Die Tendenzen der einzelnen Versuche waren aber vergleichbar. So werden hier beispielhaft Daten aus einem Versuch gezeigt.

**Tabelle 18:**  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessung von -53(wt)*nark-lacZ* und -53(-12)*nark-lacZ*-Reporterfusionen

| Stamm                         | Relevanter Genotyp        | $\beta$ -Galaktosidase-aktivität<br>(Miller Units) |            |             |
|-------------------------------|---------------------------|--|------------|-------------|
|                               |                           | aerob  | anaerob    |             |
|                               |                           |  | mit Nitrat | fermentativ |
| IGB1 (WT)                     | -53(wt) <i>nark-lacZ</i>  | <2   | 107        | 83          |
| IGB7 ( $\Delta$ <i>fnr</i> )  | -53(wt) <i>nark-lacZ</i>  | <2   | <2         | <2          |
| IGB14 ( $\Delta$ <i>rex</i> ) | -53(wt) <i>nark-lacZ</i>  | <2   | 113        | 64          |
| IGB2 (WT)                     | -53(-12) <i>nark-lacZ</i> | <2   | <2         | <2          |
| IGB8 ( $\Delta$ <i>fnr</i> )  | -53(-12) <i>nark-lacZ</i> | <2   | <2         | <2          |
| IGB15 ( $\Delta$ <i>rex</i> ) | -53(-12) <i>nark-lacZ</i> | <2   | <2         | <2          |

Die -53(wt)*nark-lacZ* Reporterfusion zeigt unter aeroben Bedingungen keine Aktivität. Unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat werden 107 Miller Units gemessen und unter fermentativen Wachstumsbedingungen 83 Miller Units. Da in dem Fnr-Knock-out-Stamm (IGB7) keine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten messbar waren, wurde erneut gezeigt, dass die anaerobe *nark-lacZ* Expression von Fnr abhängt (Tabelle 18). Dagegen ändern sich die gemessenen  $\beta$ -Galaktosidase-Werte im Rex-Knock-out-Stamm (IGB14) nicht und entsprechen den Werten des *B. subtilis* Wildtyp (Tabelle 18). Das bedeutet der Repressor Rex hat keinen Einfluss auf die *nark-lacZ* Expression.

Durch die Mutation des *nark*-Promotors liegt die Fnr-Bindestelle nun an Position -29,5 relativ zum Transkriptionsstartpunkt. Diese Verschiebung führt zu einem inaktiven *nark*-Promotor in *B. subtilis* Wildtypstamm. Weder unter anaeroben Wachstumsbedingungen mit Nitrat noch unter fermentativen Wachstumsbedingungen sind  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten messbar. Das

gleiche Ergebnis wird ebenso bei der Untersuchung des mutierten *nark*-Promotors in den *B. subtilis* Rex- oder Fnr-Knock-out-Stamm erhalten (IGB8 und IGB15) (Tabelle 18). Durch die Insertion der zwölf Basen in den *nark*-Promotor, findet die Aktivierung der Expression über Fnr nicht mehr statt. Die *-75ywcJ-lacZ* Reporterengenfusion ist unter aeroben Bedingungen im *B. subtilis* Wildtypstamm (IGB3) ebenfalls inaktiv, da unter diesen Bedingungen die Expression des *ywcJ*-Gens durch Rex reprimiert wird. Nach Kultivierung unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat werden 178 Miller Units, unter fermentativen Bedingungen im *B. subtilis* Wildtyp Stamm 273 Miller Units gemessen. Die geringere  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat, ist wiederum auf die Rex-abhängige Repression zurückzuführen. Entsprechend steigen die  $\beta$ -Galaktosidase-Werte in dem Rex-Knock-out-Stamm (IGB16) deutlich an (Tabelle 19). Dass die anaerobe *ywcJ-lacZ* Expression unabhängig von Fnr ist, kann nach Analyse der  $\beta$ -Galaktosidase-Werte im *B. subtilis* Fnr-Knock-out-Stamm (IGB9) gezeigt werden. Hier sind die  $\beta$ -Galaktosidase-Werte denen der Rex-Mutante vergleichbar. Lediglich im *B. subtilis* ResDE-Knock-out-Stamm (IGB20) ist eine deutlich verringerte  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität zu messen. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Werte gehen auf 69 Miller Units für die anaerobe Expression mit Nitrat bzw. 65 Miller Units für die fermentative Expression zurück (Tabelle 19). Dieses Experiment zeigt, dass die anaerobe *ywcJ-lacZ* Expression ResDE-abhängig ist.

Der *ywcJ*-Promotor wird durch die Insertion von 12 bp an Position -14,5 relativ zum Transkriptionsstartpunkt inaktiviert. Die *-75(+12)ywcJ-lacZ*-Reporterengenfusion ist unter allen Bedingungen im *B. subtilis* Wildtyp inaktiv, es konnten keine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten gemessen werden (IGB4, Tabelle 19). Die Verschiebung der Fnr-Erkennungssequenz an Position -41,5 relativ zum Transkriptionsstartpunkt im *ywcJ*-Promotor führt nicht zu einer Fnr-abhängigen Expression. Daher ist die Position der Fnr-Bindestelle im Promotor nicht alleine ausschlaggebend für die Funktionalität. Da die potentielle Fnr-Bindestelle mit der Erkennungssequenz des Rex-Repressors überlappt, könnte die Bindung des Repressors eine Aktivierung verhindern. Um das zu überprüfen wurde die Expression des *-75(wt)ywcJ-lacZ* sowie *-75(+12)ywcJ-lacZ* Reporterengenfusion in einem *B. subtilis* Rex-Knock-out-Stamm untersucht

(IGB16, IGB17). Das  $-75(\text{wt})ywcJ-lacZ$ -Promotorkonstrukt wird unter fermentativen Bedingungen induziert und zeigte eine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von 197 Miller Units. Dieser Wert entspricht den Werten des *B. subtilis* Wildtypstamm IGB3. Unter anaeroben Wachstumsbedingungen mit Nitrat ist die Expression mit gemessenen 224 Miller Units höher als im Wildtypstamm, da hier keine Repression durch Rex statt findet (Tabelle 19). Interessanterweise ist für die  $-75(+12)ywcJ-lacZ$  Reporter-genfusion bei anaeroben Wachstumsbedingungen mit Nitrat eine geringe  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von 19 Miller Units in dem *B. subtilis* Rex-Knock-out-Stamm (IGB17) zu messen. Diese geringe Expression in Abwesenheit von Rex deutet darauf hin, dass nun eine schwache Aktivierung durch Fnr möglich ist (Tabelle 19).

**Tabelle 19:**  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessung von  $-75(\text{wt})ywcJ-lacZ$  und  $-75(+12)ywcJ-lacZ$  Reporter-genfusionen

| Stamm                    | Relevanter Genotyp        | $\beta$ -Galaktosidase-aktivität<br>(Miller Units) |            |             |
|--------------------------|---------------------------|--|------------|-------------|
|                          |                           | aerob  | anaerob    |             |
|                          |                           |  | mit Nitrat | fermentativ |
| IGB3 (Wt)                | $-75(\text{wt})ywcJ-lacZ$ | <2   | 178        | 273         |
| IGB16 ( $\Delta rex$ )   | $-75(\text{wt})ywcJ-lacZ$ | 16   | 224        | 197         |
| IGB9 ( $\Delta fnr$ )    | $-75(\text{wt})ywcJ-lacZ$ | 4  | 244        | 229         |
| IGB20 ( $\Delta resDE$ ) | $-75(\text{wt})ywcJ-lacZ$ | 29   | 69         | 65          |
| IGB4 (Wt)                | $-75(+12)ywcJ-lacZ$       | <2   | 4          | <2          |
| IGB17 ( $\Delta rex$ )   | $-75(+12)ywcJ-lacZ$       | <2   | 19         | 4           |
| IGB10 ( $\Delta fnr$ )   | $-75(+12)ywcJ-lacZ$       | <2   | <2         | <2          |
| IGB21 ( $\Delta resDE$ ) | $-75(+12)ywcJ-lacZ$       | <2   | <2         | <2          |

Momentan ist noch nicht bekannt, wie die anaerobe Expression des  $-75(\text{wt})ywcJ-lacZ$  Konstrukts im *B. subtilis* JH642 Stamm (IGB3) vermittelt wird. Ein möglicher Aktivator der anaeroben Expression von *ywcJ* in *B. subtilis* ist der Regulator ResD. Daher wurde die Expression der  $-75(\text{wt})ywcJ-lacZ$  Reporter-genfusion auch im ResDE-Mutantenstamm (IGB20) untersucht. Mit einer  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von 69 Miller Units unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat, sowie 65 Miller Units unter fermentativen Bedingungen ist die Expression im *B. subtilis* ResDE-Knock-out-Stamm verglichen mit der im



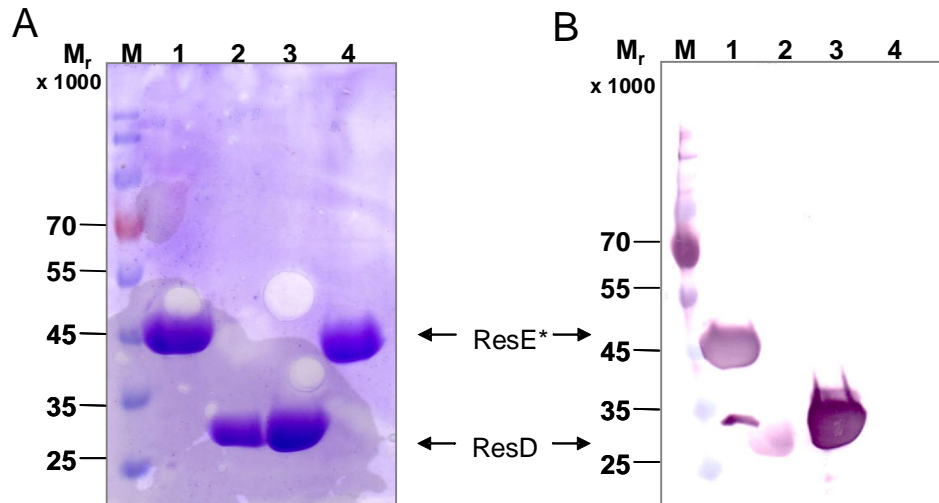
*B. subtilis* Wildtypstamm deutlich verringert. ResD wird daher für die anaerobe Expression des *ywcJ*-Gens benötigt. Durch die Insertion der 12 bp an Position -14,5 relativ zum Transkriptionsstartpunkt des *ywcJ*-Promotors wird die anaerobe Induktion verhindert (Tabelle 19). Das könnte darauf hinweisen, dass durch die Insertion wichtige Sequenzen des *ywcJ*-Promotors für die anaerobe Expression verändert werden. Ob ResD direkt an den *ywcJ*-Promotor bindet oder ein weiterer ResD-abhängiger Faktor existiert, muss noch untersucht werden. Eine Möglichkeit um eine potentielle ResD-Bindestelle im *ywcJ*-Promotor zu identifizieren, wären *in vitro* Bindungsstudien mit gereinigtem ResD über DNaseI Footprint Analysen.

#### **4.3.3 Produktion und Reinigung der Proteine ResD und ResE aus *Bacillus subtilis***

In der vorherigen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass ResD selbst oder ein ResD-abhängiger Faktor die Expression von *ywcJ* positiv reguliert. Eine ResD-Bindestelle im *ywcJ*-Promotor konnte bislang nicht identifiziert werden. DNaseI Footprint Analysen mit gereinigtem ResD und einem *ywcJ*-Promotorfragment sollen durchgeführt werden, um die Bindung von ResD an den *ywcJ*-Promotor *in vitro* zu untersuchen. Für diese Analyse sollte der Regulator ResD und die Histidin-Kinase ResE gereinigt werden.

Die Sensorkinase ResE besitzt eine Größe von 67 kDa und ist in der Zelle membrangebunden. Für die Produktion von ResE wurde nur die cytoplasmatisch lokalisierte Histidinkinasedomäne als Strep-Tag Fusionsprotein produziert. Die Histidinkinasedomäne ist funktionell und in der Lage den ResD Regulator durch Phosphorylierung zu aktivieren (Zhang and Hulett, 2000). Der ResD Regulator wurde ebenfalls als Strep-Tag Fusionsprotein produziert und gereinigt. Zur Expression der Strep-Fusionsproteine wurden das verkürzte *resE*-Gen und das *resD*-Gen in den Vektor pET52b kloniert. Der N-terminale Strep-Tag kann nach der Reinigung über eine HRV 3C Protease abgespalten werden. Mit den Konstrukten pET52b*resD* und pET52b*resE*\* wurden zur Proteinproduktion BL21C+-Zellen transformiert. Die Proteinproduktion wurde bei einer  $OD_{578nm} = 1$  durch Zugabe von 300 nM IPTG induziert. Nach 3 Stunden Proteinproduktion bei 25 °C wurden die Zellen pelletiert und die

heterolog produzierten Proteine über eine Strep-Tactin-Säule gereinigt. Der Strep-Tag wurde nach der Reinigung über die HRV 3C Protease abgetrennt. Die so erhaltenen Proteine wurde per SDS-PAGE und Western-Blot überprüft. Das erwartete ResE-Fragment besitzt eine molekulare Masse von 43 kDa und ResD eine von 27,5 kDa. Durch den N-terminalen Strep-Tag erhöht sich die molekulare Masse um jeweils 2,4 kDa.



**Abb. 50: SDS-PAGE und Western-Blot der rekombinant produzierten Proteine ResD und ResE\*** (A) SDS-PAGE der gereinigten Proteine ResD und ResE\*. (B) Western-Blot der gereinigten Proteine ResD und ResE\*. Die Probenauftragung ist für A und B gleich. Spur 1 zeigt gereinigtes ResE\* mit Strep-Tag. Spur 2 zeigt gereinigtes ResD ohne Strep-Tag, Spur 3 zeigt gereinigtes ResD mit Strep-Tag und Spur 4 zeigt gereinigtes ResE\* ohne Strep-Tag. (Spur M) zeigt die Trennung von Markerproteinen (Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Die relative molekulare Masse ist angegeben. Die gereinigten Proteine wurden nach Zugabe von SDS-PAGE-Probenpuffer 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend durch ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel getrennt (A). Die Proteine wurden durch Coomassie Brilliant Blau-Färbung sichtbar gemacht. (B) Western-Blot-Analyse der gereinigten Proteine mit einem Strep-Tactin AP conjugate (IBA, Göttingen; Deutschland). Die Auftrennung des Zellextrakts erfolgte im 12% SDS-PAGE. Die Proteine wurden daraufhin mittels Western-Blot auf eine Roti-PVDF Transfermembran übertragen und die Immundetektion mit Strep-Tactin AP Konjugat nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Auftragung entspricht der SDS-PAGE.

Die gereinigten Proteine ResD und ResE\* entsprachen der erwarteten Größe. Mit dem Strep-Tactin AP conjugate konnte der N-terminal fusionierte Strep-Tag detektiert werden (Abb. 52 B, Spur 1 und 3). Die Spaltung des Strep-Tags mit der HRV 3C Protease war für ResE\* erfolgreich, es konnte bei vorhandenem Protein kein Strep-Tag mehr durch den Antikörper detektiert werden (Abb. 52 A und B, Spur 4). Für ResD konnte noch ein geringes Vorhandensein des Strep-Tags bestimmt werden (Abb. 52 A und B, Spur 2).

Der ResD Regulator wird durch Phosphorylierung über die Histidinkinasedomäne von ResE aktiviert und bindet an DNA. *In vitro* muss daher ATP zur Phosphorylierung zugegeben werden. Für die DNaseI Footprint Analyse wurden gereinigtes ResD und ResE\* in Anwesenheit von ATP mit den *ywcJ*-Promotorfragmenten inkubiert und anschließend mit DNaseI behandelt. Dabei wurde ein publiziertes Protokoll für ResD Footprint Analysen übernommen (Zhang and Hulett, 2000). Leider zeigte die DNaseI Spaltung nicht das erwartete Ergebnis. Es konnten keine Spaltungsfragmente aufgetrennt und detektiert werden. Möglicherweise stört das ATP die DNaseI Spaltung in den eingesetzten Konzentrationen. Hier müssen die Versuchsbedingungen, wie die eingesetzte ATP-Konzentration noch weiter variiert und etabliert werden.

#### **4.3.4 Etablierung einer Analysenmethode zur Untersuchung der Protein-DNA-Bindung *in vivo***

*In vitro* konnte sowohl die Bindung von Fnr (Kap. 4.3.1) als auch von Rex an den *ywcJ*-Promotor gezeigt werden (Larsson *et al.*, 2005). Es stellt sich die Frage, unter welchen Bedingungen welcher Regulator an die überlappenden Fnr bzw. Rex Erkennungssequenz bindet. Zur Klärung dieser Frage sollte ein System zur *in vivo* Bindungsanalyse etabliert werden, wie beispielsweise die Chromatin-Affinitätsreinigung („Chromatin-affinity-purification“, ChAP)

##### **4.3.4.1 Prinzip der Chromatin-Affinitätsreinigung**

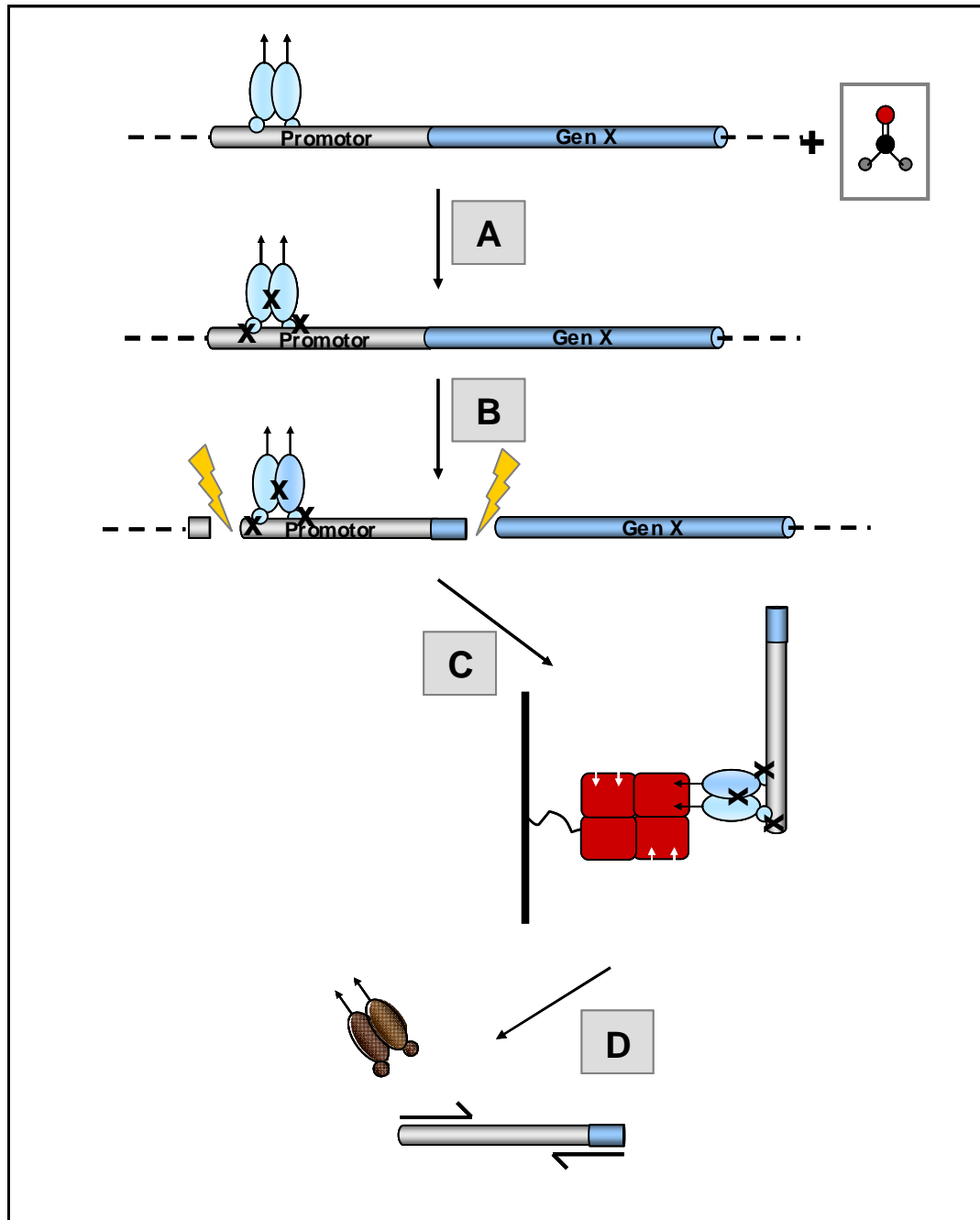
Mit Hilfe der Chromatin-Affinitätsreinigung (ChAP) ist man in der Lage Protein/DNA-Interaktionen *in vivo* nachzuweisen. Das Zielprotein mit Affinitäts-tag wird in Bakterien überproduziert. Unter Kultivierungsbedingungen in denen das Zielprotein aktiv ist, werden die Bakterienzellen mit Formaldehyd behandelt. Das Formaldehyd besitzt die Eigenschaft, Proteine oder DNA, die in unmittelbarer Nähe zueinander liegen, kovalent miteinander zu vernetzen (engl. crosslinking). Das können Protein/Protein Vernetzungen, oder auch Protein/DNA Vernetzungen sein (Abb. 51, A).

Die Reaktion findet in 2 Stufen statt. Zusammengefasst ist der Reaktionsmechanismus folgender:



Das sehr reaktive, dipolare Formaldehyd besitzt ein Kohlenstoffatom als nucleophiles Zentrum. Amino- und Iminogruppen der Proteine, wie Seitenketten von z.B. Lysin und Arginin, sowie Nukleotide wie z.B. Cytosin reagieren mit dem Formaldehyd und bilden in erster Reaktion eine Schiff'sche-Base aus. Dieses Zwischenprodukt kann dann wiederum unter Freisetzung eines Moleküls Wasser mit einer zweiten Aminogruppe reagieren, so dass es zu einer Quervernetzung zwischen Protein und Protein oder Protein und DNA kommt (McGhee and von Hippel, 1975a, 1975b). Ein Vorteil dieser Reaktion ist ihre Reversibilität. Das bedeutet, dass es durch Erhitzen in einem Tris-HCl enthaltenem Puffer zu einer Protonierung der Aminogruppen kommt und die Reaktion umkehrt wird (Orlando *et al.*, 1997).

Nach der Quervernetzung der Protein/DNA-Komplexe durch Formaldehyd erfolgt ein Zellaufschluss. Das Chromatin wird durch Ultraschallbehandlung in Fragmente zwischen 500 bis 1000 Basen gescheert (Abb. 51, B). Die gescheerte DNA kann über das quervernetzte Protein mit Affinitäts-tag über eine Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Die Quervernetzung wird aufgelöst und die DNA isoliert (Abb. 51, C). Nun können mit spezifischen Primern über eine Polymerase-Kettenreaktion die gebundenen Promotorbereiche amplifiziert werden (Abb. 51, D).



**Abb. 51: Prinzip der Chromatin-Affinitätspräzipitation-PCR (ChAP-PCR)** am Beispiel von GenX und einem Protein mit Affinitäts-tag. (A) Das Protein (braun) bindet an den Promotor von GenX. Durch Behandlung mit Formaldehyd werden Promotoren und Protein reversibel quervernetzt. (B) Nach Zellaufschluss erfolgt die Fragmentierung des Chromatins durch Ultraschall-Behandlung, wodurch das Chromatin in 500 – 1000 Basen kleine Fragmente geschnitten wird. (C) Reinigung des Proteins mit der quervernetzten DNA über Affinitätschromatographie. (D) Auflösen der Quervernetzung durch Hitze und anschließende PCR mit spezifischen Primern in der Promotorregion.

#### 4.3.4.2 Heterologe Produktion von *Bacillus subtilis* Strep-Fnr und Rex-Strep

Zur Untersuchung der *in vivo* Bindung von Fnr und Rex aus *B. subtilis* sollte zunächst ein geeignetes System für eine stabile, rekombinante Proteinproduktion und Reinigung der Proteine etabliert werden. Für die Proteinproduktion in *B. subtilis* wurde der Vektor pBQ200 (Martin-Verstraete *et al.*, 1994) genutzt. In die multiple cloning site wurden das *fnr*-Gen mit einem N-terminal kodierten Strep-Tag bzw. das *rex*-Gen mit einem C-terminal kodierten Strep-Tag inseriert. Mit dem Konstrukt pBQstrep-*fnr* wurde der *B. subtilis* Stamm HRB3 transformiert, welcher eine endogene *narG-lacZ* Fusion und ein durch eine Spectinomycin-Resistenzkassette inaktiviertes *fnr*-Gen trägt. Mit dem Konstrukt pBQrex-strep wurde der *B. subtilis* Stamm IGB25 transformiert, welcher eine endogene *ywcJ-lacZ* Fusion, sowie ein durch eine Kanamycinresistenzkassette deletiertes *rex*-Gen trägt.

Über die Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der *narG-lacZ* bzw. *ywcJ-lacZ* Reporterengenfusion kann überprüft werden, ob Strep-Fnr bzw. Rex-Strep in der Lage ist die Deletion des Stamms zu komplementieren. Die *B. subtilis* Stämme IGB24 und IGB26 wurden aerob (A), anaerob mit 10 mM Nitrat (N) und fermentativ (F) in SMM-Medium 6 Stunden bei 37 °C und 100 upm in Transfusionsflaschen mit Septum inkubiert, für die aerobe Kultivierung wurden Erlenmeyerkolben verwendet und bei 200 upm inkubiert. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde nach sechs Stunden bestimmt.

**Tabelle 20:** Aktivitätsuntersuchung der Fusionsproteine Strep-Fnr und Rex-Strep

| Stamm | Relevanter Genotyp                  | $\beta$ -Galaktosidase-aktivität<br>(Miller Units) |            |             |
|-------|-------------------------------------|--|------------|-------------|
|       |                                     | aerob  | anaerob    |             |
|       |                                     |  | mit Nitrat | fermentativ |
| IGB24 | <i>fnr::spc narG-lacZ</i> pBQfnr    | <2   | 4          | 28          |
| IGB26 | <i>rex::kan ywcJ-lacZ</i><br>pBQrex | <2   | 50         | 13          |

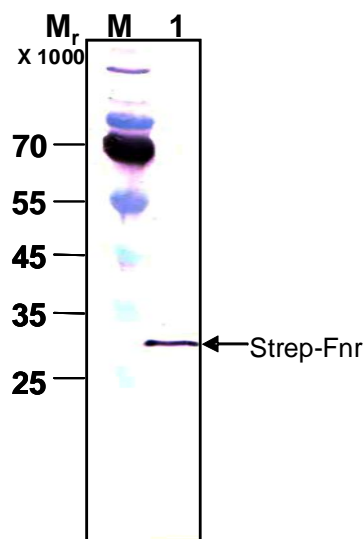
Unter aeroben Bedingungen konnte keine Strep-Fnr Aktivität gemessen werden, da dieser Regulator nur unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat oder

fermentativ aktiv ist. Hier konnte eine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von 50 bzw. 13 Miller Units gemessen werden (Tabelle 20).

Die Aktivität des Repressors Rex ist abhängig vom Redoxpotential der Zelle, also der Konzentration der Reduktionsäquivalenten NADH/NAD<sup>+</sup>. Unter aeroben Bedingungen ist Rex aktiv und reprimiert die Expression des *ywcJ*-Gens. Erhöht sich das NADH/NAD<sup>+</sup> Verhältnis in der Zelle, bindet Rex NADH und kann in diesem Konformationszustand nicht weiter an DNA binden. (Brekasis and Paget, 2003; Wang *et al.*, 2008). Dies ist im Anstieg der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität zu beobachten. Unter aeroben Bedingungen ist keine Aktivität messbar, da die Expression durch Rex reprimiert wird. Unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat steigt die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität auf ca. 4 Miller Units und unter fermentativen Bedingungen auf 30 Miller Units (Tabelle 20).

Das inaktivierten *rex*- bzw. *fnr*-Gen in *B. subtilis* konnten durch die Fusionsproteine Strep-Fnr bzw. Rex-Strep komplementiert werden. Somit konnte sowohl der Transkriptionsfaktor Strep-Fnr, sowie der Repressor Rex-Strep erfolgreich produziert und die Funktionalität dieser beiden Regulatoren bestätigt werden.

Die weitere Etablierung der ChAP wurde mit dem Strep-Fnr vorgenommen. Die Produktion des Strep-Fnr Fusionsproteins wurde nach sechs Stunden Kultivierung unter anaeroben Bedingungen mit 10 mM Nitrat über eine SDS-PAGE analysiert. Weiterhin wurde eine Westernblot Analyse mit einem Strep-Tactin AP Konjugat durchgeführt (Abb. 52).



**Abb. 52: Rekombinante Darstellung des Fnr als Fusion mit einem N-terminalen Strep-Tag**

Gezeigt ist die Westernblotanalyse des Proteingemisch des Zellextrakts aus *B. subtilis* (IGB26) mit konstitutiv exprimierten Vektor pBQstrep-fnr. (Spur1) nach 6 Stunden Wachstum unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat Zugabe bei einer  $OD_{578}=0,8$ , Spur M zeigt die Trennung von Markerproteinen (Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Die relative molekulare Masse ist angegeben. Die Westernblot-Analyse des Zellextraktes wurde mit dem Strep-Tactin AP Konjugat (IBA, Göttingen; Deutschland) durchgeführt. Die Auftrennung des Zellextraktes erfolgte im 12% SDS-PAGE. Die Proteine wurden daraufhin per Western-Blot auf eine Roti-PVDF Transfermembran übertragen und die Immundetektion mit Strep-Tactin AP conjugate nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Hierfür wurde eine Probe  $OD_{578nm}=3$  des Zellextrakts mit 40  $\mu$ l Lysepuffer für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, anschließend mit 15  $\mu$ l SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert. 15  $\mu$ l von diesem Gemisch wurden auf die SDS-PAGE aufgetragen und anschließend für eine Western-Blot-Analyse auf eine Roti-PVDF Transfermembran geblottet. Die Immunodetektion erfolgte mit dem Strep-Tactin AP Konjugat (IBA, Göttingen; Deutschland). Erwartungsgemäß wurde bei einer molekularen Masse von 29000 eine Bande detektiert, welches dem Fusionsprotein Strep-Fnr entspricht, dessen Strep-Tag durch das Strep-Tactin AP conjugate erkannt wurde. Das Strep-Fnr konnte somit erfolgreich in *B. subtilis* produziert werden.

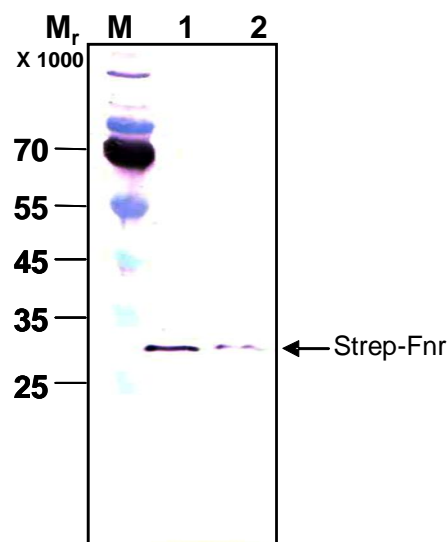
#### 4.3.4.3 Reinigung von Strep-Fnr-DNA-Komplexen aus *Bacillus subtilis*

Für die weitere Analyse der Protein/DNA-Komplexbildung wurde eine Quervernetzung des Fusionsproteins mit seiner spezifischen DNA-Erkennungssequenz durchgeführt. Die Quervernetzung wurde durch die Zugabe von Paraformaldehyd in einer finalen Konzentration von 0,6 % (v/v)



unter Ausschluss von Sauerstoff, bei einer  $OD_{578nm} = 1$  erreicht (Herzberg *et al.*, 2007). Dieses wurde erstmals nur für Strep-Fnr etabliert.

Die Inkubation mit Paraformaldehyd wurde 20 min schüttelnd bei 37 °C unter Ausschluss von Sauerstoff durchgeführt. Zum Abstoppen der Reaktion wurde dem Medium Glycin zugegeben. Das Abstoppen beugt zu starker Quervernetzung des Chromatins vor, welches die folgende Schritte behindern würde. Zur Überprüfung der Produktion des Fusionsproteins wurde nach der Paraformaldehyd-Behandlung eine Kulturprobe entnommen und diese nach Zellaufschluss über eine SDS-PAGE und mittels Western-Blot analysiert (Abb. 53).



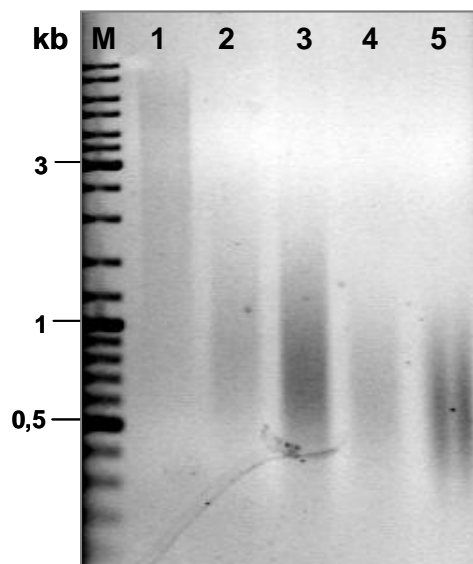
**Abb. 53: Rekombinante Darstellung des Fnr als Fusion mit einem N-terminalen Strep-Tag mit und ohne Formaldehyd Behandlung** Gezeigt sind die Proteine des Zellextrakts aus *B. subtilis* (IGB24) mit konstitutiv exprimiertem Vektor pBQstrep-fnr mit und ohne Formaldehyd-Behandlung: Spur 1 nach 6 Stunden Wachstum unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat bei einer  $OD_{578nm} = 0,8$  sowie nach 20 Minuten zusätzlicher Behandlung mit Formaldehyd (Spur 2), Spur M zeigt die Trennung von Markerproteinen (Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Die relative molekulare Masse ist angegeben. Die Westernblot-Analyse des Zellextraktes erfolgte mit einem Antikörper Strep-Tactin AP Konjugat (IBA, Göttingen; Deutschland). Die Auftrennung des Zellextrakts erfolgte durch eine 12% SDS-PAGE. Die Proteine wurden daraufhin mittels Western-Blot auf eine Roti-PVDF Transfermembran übertragen und die Immundetektion mit Strep-Tactin AP Konjugat nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Die Westernblot-Analyse mit einem gegen den Strep-Tag gerichteten Antikörper, zeigt bei einer erwarteten relativen molekularen Masse von 29000 eine Bande, die dem Strep-Fnr Fusionsprotein entspricht.

Nach dem Crosslinking mit Paraformaldehyd wurden die Zellen für weitere Analysen pelletiert, mit PBS-Puffer pH 8,0 gewaschen und in einem Volumen von 1 ml resuspendiert.

Für den folgenden Zellaufschluss wurde eine enzymatische sowie eine mechanische Methode getestet. Der enzymatische Zellaufschluss wurde durch die Behandlung der Zellen mit Lysozym durchgeführt. Der Zellaufschluss wurde mikroskopisch alle 30 Minuten überprüft. Ein erfolgreiches Ergebnis konnte erst nach 3 Stunden bei 37 °C erreicht werden. Für einen mechanischen Aufschluss der Zellen wurde der Fastprep-Homogenisator (MP Biomedicals) gewählt. Durch die Behandlung mit Präzisionskugeln aus Kalknatronglas mit einem Durchmesser von ca. 0,04 mm, einer Aufschlusszeit von 2 x 45 s und einer Geschwindigkeit von 6,5 m/s war der Zellaufschluss erfolgreich. Mikroskopisch konnten nach der Behandlung ausschließlich Zelltrümmer detektiert werden. Die Methode war reproduzierbar.

Nach dem Zellaufschluss erfolgte eine Fragmentierung der DNA durch Ultraschall in Fragmente mit einer Größe von 500 bis 1000 Basen. Nach jedem Zyklus wurde eine Probe des Gemischs entnommen und mittels Gelelektrophorese analysiert (Abb. 54).



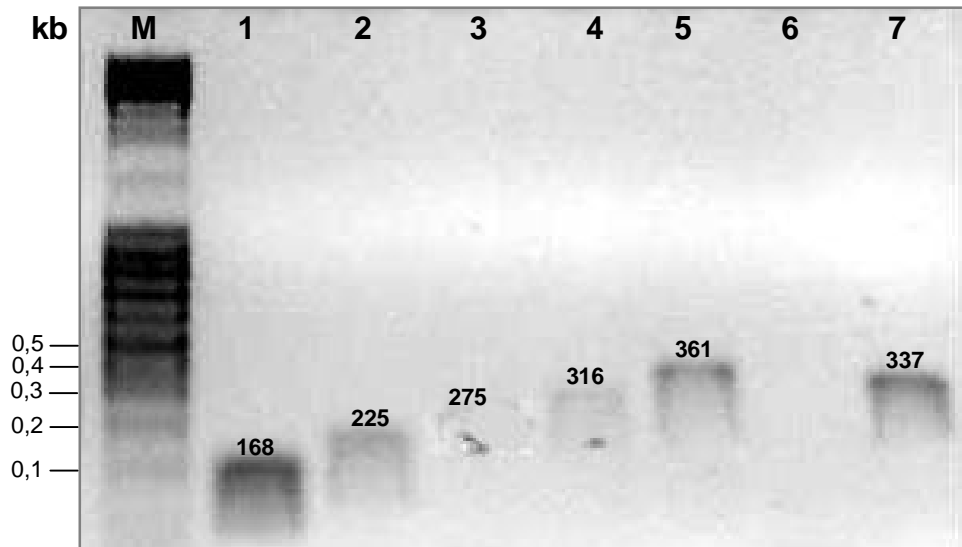
**Abb. 54: Fragmentierung des Chromatins.** Ultraschall-behandelter Chromatinextrakt von Formaldehyd behandelten *B. subtilis* Zellen. Es wurden je 10 µl Extrakt aufgetragen. Spur M zeigt den Marker (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Fermentas) Spur 1 zeigt den quervernetzten Chromatin-Rohextrakt. Spur 2 zeigt den ultraschall-behandelten Chromatinextrakt 1x1 min. Spur 3 zeigt den Ultraschall-behandelten Chromatinextrakt 2x1 min. Spur 4 zeigt den Ultraschall-behandelten Chromatinextrakt 3x1 min. Spur 5 zeigt den Ultraschall-behandelten Chromatinextrakt 4x1 min. Die Auftrennung erfolgte im 1%igen Agarosegel. Die DNA wurde mit Ethidiumbromid angefärbt und mit UV-Licht detektiert.

Die unbehandelte DNA auf dem Agarosegel zeigt eine Größe von 1-10 kb (Abb. 54, Spur 1). Durch die Behandlung mit Ultraschall ist eine deutliche Verringerung der Größe der DNA zu beobachten. Nach einem Zyklus von 4 x 1 Minute, mit je 2 min Pause entspricht die fragmentierte DNA der gewünschten Größe von 0,5 bis 1 kb Länge (Abb. 54, Spur 5).

Nach der Behandlung mit Ultraschall wurde das DNA-Proteingemisch über eine 500 µl Strep-Tactin-Affinitätssäule gereinigt. Spezifische Wechselwirkungen des Strep-Tags der Fusionsproteine mit dem Strep-Tactin, welches kovalent an Sepharose gekoppelt ist, ermöglichte eine affinitätschromatographische Reinigung des Protein/DNA-Komplexes. Die Elution erfolgte mit 5 Säulenvolumen eines desthiobiotinhaltigen Puffers.

Die Elutionsfraktionen wurden anschließend 16 Stunden bei 65 °C inkubiert, um die Quervernetzung zwischen Protein und DNA zu lösen.

Darufhin wurde die DNA gereinigt und in eine Polymerasenkettenreaktion eingesetzt. Hierfür wurden Primer gewählt die spezifisch ein 168 bp langes *ldh*-Fragment (-113 bis +55 relativ zum Transkriptionsstartpunkt), ein 429 bp langes *ywcJ*- Fragment (-166 bis +263 relativ zum Transkriptionsstartpunkt), ein 361 bp langes *alsS*- Fragment (-48 bis +313 relativ zum Transkriptionsstartpunkt), ein 316 bp langes *arfM*- Fragment (-87 bis +188 relativ zum Transkriptionsstartpunkt), ein 275 bp langes *narK*- Fragment (-85 bis +231 relativ zum Transkriptionsstartpunkt) und ein 225 bp langes *narG*- Fragment (-85 bis +231 relativ zum Transkriptionsstartpunkt) amplifizieren. Als Negativkontrolle wurde ein 337 bp Bereich (+38 bis +375 relativ zum Transkriptionsstartpunkt) aus *jag* gewählt, der keine Fnr-Bindesequenz beinhaltet. Die Proben wurden über ein Agarosegel analysiert (Abb. 55).



**Abb. 55: Identifizierung der über den Fnr-DNA-Komplex gereinigten DNA.** 10 µl der durch Polymerasekettenreaktion amplifizierten DNA wurden zur Analyse auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Spur M: Marker (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Fermentas). Spur 1 zeigt das amplifizierte *ldh*-Fragment mit einer Größe von 168 bp. Spur 2 zeigt das amplifizierte *narG*-Fragment mit einer Größe von 225 bp. Spur 3 zeigt das amplifizierte *narK*-Fragment mit einer Größe von 275 bp. Spur 4 zeigt das amplifizierte *arfM*-Fragment mit einer Größe von 316 bp. Spur 5 zeigt das amplifizierte *alsS*-Fragment mit einer Größe von 361 bp. Spur 6 zeigt kein amplifiziertes *ywcJ*-Fragment mit einer Größe von 429 bp. Spur 7 zeigt als Negativkontrolle das amplifizierte *jag*-Fragment mit einer Größe von 337 bp. Die Auftrennung erfolgte im 1%igen Agarosegel. Die DNA wurde mit Ethidiumbromid angefärbt und mittels UV-Licht angefärbt.

Die verschiedenen Fragmente zeigten die jeweils erwarteten Größen bei 168, 225, 275, 316, 316 und 337 bp (Abb. 55). Für das *ywcJ*-Fragment konnte keine Bande detektiert werden (Abb. 55, Spur 6). Die Amplifikation des *jag*-Fragments, welches als Negativkontrolle verwendet wurde, zeigte jedoch ebenfalls eine Bande (Abb. 55, Spur 7). Erwartet worden war eine spezifische Anreicherung der genomischen DNA durch Fnr Bindung für den *narG*, *narK* sowie den *arfM*-Promotor. Der *jag*-Promotor enthält keine Fnr-Bindestelle und hätte nicht über die Bindung von Fnr angereichert werden dürfen. Dies weist darauf hin, dass die genomische DNA nicht spezifisch angereichert wurde, sondern unspezifisch an der Strep-Tactin-Säule verweilt und eluiert wird. Die Endpunkt PCR mit 30 Zyklen wie sie hier genutzt wurde ist nicht geeignet um geringe Mengenunterschiede nachzuweisen. Eine Möglichkeit wäre die spezifische Detektion der angereicherten genomischen DNA mittels quantitativer real time PCR.

Weiterführende Arbeiten sollen zeigen, ob eine Analyse der erhaltenen DNA-Fragmente durch eine quantitative real time PCR deutlichere Ergebnisse zeigt. Für die Reinigung des Protein/DNA-Komplexes sollte weiter untersucht werden,

ob eine Reinigung über eine Immunpräzipitation mit Hilfe eines Strep-Tactin gekoppelten Antikörpers weniger DNA-Kontamination mit sich führt.

## 5. Zusammenfassung

Der Redoxregulator Fnr aus *Bacillus subtilis* ist ein wichtiger Faktor in der Anpassung an die Anaerobiose dieses Organismus. Das Fnr besitzt im aktiven Zustand ein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum, welches über 3 Cysteinreste koordiniert wird. In dieser Arbeit konnte durch Mutationsanalysen, sowie Mößbauerspektroskopie der Aspartatrest an Position 141 im Fnr-Protein, als vierter Ligand identifiziert werden. Durch Mößbauerspektroskopie ergaben sich erste Hinweise für die Degradation des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums über ein  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Zentrum. Durch Mutationsanalysen und DNase I Footprint Analysen, konnten die Aminosäurereste R189 und E190 im Helix-Turn-Helix-Motiv des *B. subtilis* Fnrs als essentiell für die Bindung an die DNA identifiziert werden, und stellen daher die Kontaktstellen mit der Fnr Erkennungssequenz dar. Durch Mutationsanalysen und *in vitro* Transkriptionsanalysen konnte ein Loop (AS 61-65) in der Struktur des Fnrs identifiziert werden, der über die Aminosäurereste Asp63 und Gly64 einen direkten Kontakt zu der RNA-Polymerase eingeht und darüber die Transaktivierung vermittelt.

Untersuchungen zur Promotorstruktur anaerob induzierter Gene aus *B. subtilis* zeigten, dass die genaue Positionierung der palindromischen Sequenz des Fnrs bei -40,5 bzw. -41,5 wichtig für die Fähigkeit der Transaktivierung durch Fnr ist. Darüberhinaus konnte durch Expressionsstudien mit Reportergenfusionen gezeigt werden, dass das *ywcJ*-Gen, welches für einen potentiellen Nitrittransporter kodiert, nicht Fnr reguliert wird. Eine Fnr-abhängige Regulation wurde auch nicht erreicht, wenn die potentielle Fnr Bindestelle des *ywcJ* Promotors durch Insertion von 12 bp an die optimale Position von -41,5 in Relation zum Transkriptionsstartpunkt verschoben wurde. Die *ywcJ* Expression wird unter anaeroben Wachstumsbedingungen mit Nitrat über Rex reprimiert und die anaerobe Expression wird durch ResD oder einen ResD abhängigen Faktor reguliert.

Die ResE\*- und ResD-Protein aus *B. subtilis*, sowie das FnrCCCC aus *Geobacillus stearothermophilus* konnte in dieser Arbeit erfolgreich rekombinant produziert und gereinigt werden. Eine weitergehende Charakterisierung des FnrCCCC aus *G. stearothermophilus* durch Bestimmung des Eisengehaltes,

UV/VIS-Spektroskopie, Gelpermeationschromatographie und DNaseI Footprint Analysen, zeigte dass auch dieses Fnr im inaktiven und aktiven Zustand als ein Homodimer vorliegt, welches ein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum pro Monomer beinhaltet. Weiter erkennt das Fnr aus *G. stearothermophilus*, die gleiche palindromische DNA-Bindesequenz wie das Fnr aus *B. subtilis*. Erste Kristallisationsversuche mit dem Fnr aus *G. stearothermophilus* führten zu kristallinen Nadeln und Plättchen, die jedoch noch nicht für die Strukturauflösung geeignet waren.

## 6. Ausblick

Wichtige biochemische Charakteristika des *Bacillus subtilis* Fnr wurden in dieser Arbeit untersucht. Dazu gehören die Identifizierung des vierten Liganden des Eisen-Schwefel-Zentrums, die Aminosäuren des Helix-Turn-Helix-Motivs, die direkt mit der DNA wechselwirken, sowie eine Kontaktstelle mit der RNA-Polymerase. Es wurde eine experimentelle Grundlage für weitere Untersuchungen geschaffen.

Folgende Arbeiten sollten sich mit diesen Fragestellungen beschäftigen:

- Über Mutagenese des Aminosäurerests Arg194 im Helix-Turn-Helix-Motiv des Fnr und DNA-Bindungsstudien soll gezeigt werden, ob dieser Aminosäurerest im Fnr ebenfalls an der direkten Wechselwirkung mit der DNA beteiligt ist.
- Durch die Mutagenese von Ala186 zu Gly186 im Helix-Turn-Helix-Motiv des Fnr und DNA-Bindungsstudien soll gezeigt werden ob durch diese Mutation eine bessere DNA-Bindung erreicht werden kann.
- Durch Mutagenese des Aminosäurerests Leu60 in der Kontaktstelle AR3 des Fnr zur RNAP, soll durch *in vitro* Transkriptions Analysen gezeigt werden, ob dieser einen weiteren wichtiger Kontakt zur RNAP darstellt.
- Durch Mutagenese von Aminosäureresten im potentielle Loop zwischen der  $\alpha$ D- und  $\alpha$ E-Helix des Fnr soll durch *in vitro* Transkriptions Analysen gezeigt werden, ob diese Domäne im Fnr aus *B. subtilis* eine weitere Kontaktstelle zur RNAP darstellt.
- Durch Mutagenese von Aminosäureresten in der  $\alpha$ C-Helix des Fnr, und Gelpermeationschromatographie Analysen sollen die für die Dimerisierung des Fnr wichtigen Aminosäurereste identifiziert werden.
- Durch DNA-Bindungsstudien mit Fragmenten, die Mutation einzelner Basen der Fnr-Erkennungssequenz tragen soll gezeigt werden mit welchen Basen der palindromischen DNA-Sequenz die Aminosäuren Arg189 und Glu190 des Helix-Turn-Helix-Motivs des Fnr wechselwirken.



- Durch Proteolyse Versuche mit inaktivem und aktivem Fnr, sollte ein Hinweis auf einen zu Crp vergleichbaren Aktivierungsmechanismus über die  $\alpha$ D-Helix erreicht werden.
- Das FnrCCCC aus *G. stearothermophilus* konnte in dieser Arbeit in einem hohen Maßstab produziert und gereinigt werden. Erste Kokristallisationsversuche mit DNA wurden unternommen. In weiteren Arbeiten soll durch Testen verschiedener Oligonukleotide ein für die Kokristallisation von DNA mit dem FnrCCCC geeignetes Oligonukleotid gefunden werden, mit dem eine erfolgreiche Kristallisation möglich ist.
- Mit einer quantitativen real time PCR soll die Quantifizierung der DNA nach ChAP Anreicherung erreicht werden.
- Mittels Dnasel Footprint Analysen mit ResD an *ywcJ* soll eine Bindestelle identifiziert werden.

## 7. Referenzen

- Albrecht, A.G., Netz, D.J., Miethke, M., Pierik, A.J., Burghaus, O., Peuckert, F., Lill, R., and Marahiel, M.A.** (2010) SufU is an essential iron-sulfur cluster scaffold protein in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **192**: 1643-1651.
- Avila, J., Hermoso, J.M., Vinuela, E., and Salas, M.** (1970) Subunit composition of *B. subtilis* RNA polymerase. *Nature* **226**: 1244-1245.
- Baichoo, N., and Helmann, J.D.** (2002) Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J Bacteriol* **184**: 5826-5832.
- Beinert, H.** (2000) Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *J Biol Inorg Chem* **5**: 2-15.
- Bell, A., and Busby, S.** (1994) Location and orientation of an activating region in the *Escherichia coli* transcription factor, FNR. *Mol Microbiol* **11**: 383-390.
- Blake, T., Barnard, A., Busby, S.J., and Green, J.** (2002) Transcription activation by FNR: evidence for a functional activating region 2. *J Bacteriol* **184**: 5855-5861.
- Brekasis, D., and Paget, M.S.** (2003) A novel sensor of NADH/NAD<sup>+</sup> redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Embo J* **22**: 4856-4865.
- Britt, R.D., Sauer, K., Klein, M.P., Knaff, D.B., Kriauciunas, A., Yu, C.A., Yu, L., and Malkin, R.** (1991) Electron spin echo envelope modulation spectroscopy supports the suggested coordination of two histidine ligands to the Rieske Fe-S centers of the cytochrome b6f complex of spinach and the cytochrome bc1 complexes of *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter sphaeroides* R-26, and bovine heart mitochondria. *Biochemistry* **30**: 1892-1901.
- Busby, S., and Ebright, R.H.** (1999) Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol* **293**: 199-213.
- Calzolari, L., Gorst, C.M., Zhao, Z.H., Teng, Q., Adams, M.W., and La Mar, G.N.** (1995) 1H NMR investigation of the electronic and molecular structure of the four-iron cluster ferredoxin from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. Identification of Asp 14 as a cluster ligand in each of the four redox states. *Biochemistry* **34**: 11373-11384.
- Claus, D., R. C. W. Berkeley** (1986) *Genus Bacillus. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, MD.: Williams & Wilkens.

- Cosper, M.M., Jameson, G.N., Hernandez, H.L., Krebs, C., Huynh, B.H., and Johnson, M.K.** (2004) Characterization of the cofactor composition of *Escherichia coli* biotin synthase. *Biochemistry* **43**: 2007-2021.
- Crack, J., Green, J., and Thomson, A.J.** (2004) Mechanism of oxygen sensing by the bacterial transcription factor fumarate-nitrate reduction (FNR). *J Biol Chem* **279**: 9278-9286.
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M., and Brenner, S.E.** (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* **14**: 1188-1190.
- Crothers, D.M., and Steitz, T.A.** (1992) Transcriptional activation by *Escherichia coli* Crp protein. In *Transcriptional Regulation*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 501-534.
- Cruz-Ramos, H., Boursier, L., Moszer, I., Kunst, F., Danchin, A., and Glaser, P.** (1995) Anaerobic transcription activation in *Bacillus subtilis*: identification of distinct FNR-dependent and -independent regulatory mechanisms. *Embo J* **14**: 5984-5994.
- Cruz-Ramos, H., Hoffmann, T., Marino, M., Nedjari, H., Presecan-Siedel, E., Dreesen, O., Glaser, P., and Jahn, D.** (2000) Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *J Bacteriol* **182**: 3072-3080.
- Cruz Ramos, H., Hoffmann, T., Marino, M., Nedjari, H., Presecan-Siedel, E., Dreesen, O., Glaser, P., and Jahn, D.** (2000) Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *J Bacteriol* **182**: 3072-3080.
- Dower, W.J., Miller, J.F., and Ragsdale, C.W.** (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**: 6127-6145.
- Ebright, R.H., Kolb, A., Buc, H., Kunkel, T.A., Krakow, J.S., and Beckwith, J.** (1987) Role of glutamic acid-181 in DNA-sequence recognition by the catabolite gene activator protein (CAP) of *Escherichia coli*: altered DNA-sequence-recognition properties of [Val181]CAP and [Leu181]CAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 6083-6087.
- Ebright, R.H., Ebright, Y.W., and Gunasekera, A.** (1989) Consensus DNA site for the *Escherichia coli* catabolite gene activator protein (CAP): CAP exhibits a 450-fold higher affinity for the consensus DNA site than for the *E. coli* lac DNA site. *Nucleic Acids Res* **17**: 10295-10305.
- Ebright, R.H.** (1991) Identification of amino acid-base pair contacts by genetic methods. *Methods Enzymol* **208**: 620-640.
- Ebright, R.H.** (1993) Transcription activation at Class I CAP-dependent promoters. *Mol Microbiol* **8**: 797-802.

- Ebright, R.H., and Busby, S.** (1995) The *Escherichia coli* RNA polymerase alpha subunit: structure and function. *Curr Opin Genet Dev* **5**: 197-203.
- Eiting, M., Hageluken, G., Schubert, W.D., and Heinz, D.W.** (2005) The mutation G145S in PrfA, a key virulence regulator of *Listeria monocytogenes*, increases DNA-binding affinity by stabilizing the HTH motif. *Mol Microbiol* **56**: 433-446.
- Engler-Blum, G., Meier, M., Frank, J., and Muller, G.A.** (1993) Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than <sup>32</sup>P-based hybridizations. *Anal Biochem* **210**: 235-244.
- Flint, D.H., and Allen, R.M.** (1996) Iron-sulfur proteins with Nonredox Functions. *Chem Rev* **96**: 2315-2334.
- Frädrich, C.** (2007) Mutationsanalyse des Redoxregulators Fnr aus *Bacillus subtilis*. Vol. Bachelor Braunschweig: Technische Universität Braunschweig.
- Frazzon, J., and Dean, D.R.** (2003) Formation of iron-sulfur clusters in bacteria: an emerging field in bioinorganic chemistry. *Curr Opin Chem Biol* **7**: 166-173.
- Gaballa, A., Cao, M., and Helmann, J.D.** (2003) Two MerR homologues that affect copper induction of the *Bacillus subtilis* copZA operon. *Microbiology* **149**: 3413-3421.
- Glaser, P., Danchin, A., Kunst, F., Zuber, P., and Nakano, M.M.** (1995) Identification and isolation of a gene required for nitrate assimilation and anaerobic growth of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **177**: 1112-1115.
- Green, J., and Guest, J.R.** (1993a) A role for iron in transcriptional activation by FNR. *FEBS Lett* **329**: 55-58.
- Green, J., and Guest, J.R.** (1993b) Activation of FNR-dependent transcription by iron: an in vitro switch for FNR. *FEMS Microbiol Lett* **113**: 219-222.
- Guest, J.R., Green, J., Irvine, S., and Spiro, S.** (1996) The FNR Modulon and FNR-regulated Gene Expression. In *Regulation of Gene Expression in Escherichia coli*. Lin, E.C. and Lynch, A. (eds). N. Y.: Chapman & Hall, New York.
- Haldenwang, W.G.** (1995) The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev* **59**: 1-30.

- Hartig, E., Geng, H., Hartmann, A., Hubacek, A., Munch, R., Ye, R.W., Jahn, D., and Nakano, M.M.** (2004) *Bacillus subtilis* ResD induces expression of the potential regulatory genes *yclJK* upon oxygen limitation. *J Bacteriol* **186**: 6477-6484.
- Helmann, J.D.** (1999) Anti-sigma factors. *Curr Opin Microbiol* **2**: 135-141.
- Herzberg, C., Weidinger, L.A., Dorrbecker, B., Hubner, S., Stulke, J., and Commichau, F.M.** (2007) SPINE: a method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions in vivo. *Proteomics* **7**: 4032-4035.
- Hoffmann, T., Troup, B., Szabo, A., Hungerer, C., and Jahn, D.** (1995) The anaerobic life of *Bacillus subtilis*: cloning of the genes encoding the respiratory nitrate reductase system. *FEMS Microbiol Lett* **131**: 219-225.
- Hoffmann, T., Frankenberg, N., Marino, M., and Jahn, D.** (1998) Ammonification in *Bacillus subtilis* utilizing dissimilatory nitrite reductase is dependent on resDE. *J Bacteriol* **180**: 186-189.
- Homuth, G., Rompf, A., Schumann, W., and Jahn, D.** (1999) Transcriptional control of *Bacillus subtilis* hemN and hemZ. *J Bacteriol* **181**: 5922-5929.
- Huang, M., Oppermann-Sanio, F.B., and Steinbuchel, A.** (1999) Biochemical and molecular characterization of the *Bacillus subtilis* acetoin catabolic pathway. *J Bacteriol* **181**: 3837-3841.
- John S. Rieske, D.H.M.a.R.C.** (1964) Isolation and properties of an iron-protein from the (reduced Coenzyme Q)-cytochrome c reductase complex of the respiratory chain. *Biochemicals and Biophysical Research Communications* **15**: 339-344.
- Khoroshilova, N., Beinert, H., and Kiley, P.J.** (1995) Association of a polynuclear iron-sulfur center with a mutant FNR protein enhances DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 2499-2503.
- Khoroshilova, N., Popescu, C., Munck, E., Beinert, H., and Kiley, P.J.** (1997) Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O<sub>2</sub>: [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 6087-6092.
- Kiley, P.J., and Beinert, H.** (1998) Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster. *FEMS Microbiol Rev* **22**: 341-352.
- Kim, J., Adhya, S., and Garges, S.** (1992) Allosteric changes in the cAMP receptor protein of *Escherichia coli*: hinge reorientation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 9700-9704.

- Kimura, S., Kikuchi, A., Senda, T., Shiro, Y., and Fukuda, M. (2005) Tolerance of the Rieske-type [2Fe-2S] cluster in recombinant ferredoxin BphA3 from *Pseudomonas* sp. KKS102 to histidine ligand mutations. *Biochem J* **388**: 869-878.
- Körner, H., Sofia, H.J., and Zumft, W.G. (2003) Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 559-592.
- Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, S. C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton, N. J. Cummings, and R. A. Daniel, F.D., K. M. Devine, A. Dusterhoft, S. D. Ehrlich, P. T. Emmerson, K. D. Entian, J. Errington, C. Fabret, E. Ferrari, D. Foulger, C. Fritz, M. Fujita, Y. Fujita, S. Fuma, A. Galizzi, N. Galleron, S. Y. Ghim, P. Glaser, A. Goffeau, E. J. Golightly, G. Grandi, G. Guiseppi, B. J. Guy, K. Haga, J. Haiech, C. R. Harwood, A. Henaut, H. Hilbert, S. Holsappel, S. Hosono, M. F. Hullo, M. Itaya, L. Jones, B. Joris, D. Karamata, Y. Kasahara, M. Klaerr-Blanchard, C. Klein, Y. Kobayashi, P. Koetter, G. Koningstein, S. Krogh, M. Kumano, K. Kurita, A. Lapidus, S. Lardinois, J. Lauber, V. Lazarevic, S. M. Lee, A. Levine, H. Liu, S. Masuda, C. Mauel, C. Medigue, N. Medina, R. P. Mellado, M. Mizuno, D. Moestl, S. Nakai, M. Noback, D. Noone, M. O'Reilly, K. Ogawa, A. Ogiwara, B. Oudega, S. H. Park, V. Parro, T. M. Pohl, D. Portetelle, S. Porwollik, A. M. Prescott, E. Presecan, P. Pujic, B. Purnelle, G. Rapoport, M. Rey, S. Reynolds, M. Rieger, C. Rivolta, E. Rocha, B. Roche, M. Rose, Y. Sadaie, T. Sato, E. Scanlan, S. Schleich, R. Schroeter, F. Scoffone, J. Sekiguchi, A. Sekowska, S. J. Seror, P. Serror, B. S. Shin, B. Soldo, A. Sorokin, E. Tacconi, T. Takagi, H. Takahashi, K. Takemaru, M. Takeuchi, A. Tamakoshi, T. Tanaka, P. Terpstra, A. Tognoni, V. Tosato, S. Uchiyama, M. Vandenbol, F. Vannier, A. Vassarotti, A. Viari, R. Wambutt, E. Wedler, H. Wedler, T. Weitzenegger, P. Winters, A. Wipat, H. Yamamoto, K. Yamane, K. Yasumoto, K. Yata, K. Yoshida, H. F. Yoshikawa, E. Zumstein, H. Yoshikawa and A. Danchin (1998) The complete genome sequence of the grampositive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256.
- Lamberg, K.E., Luther, C., Weber, K.D., and Kiley, P.J. (2002) Characterization of activating region 3 from *Escherichia coli* FNR. *J Mol Biol* **315**: 275-283.
- Lanzilotta, W.N., Schuller, D.J., Thorsteinsson, M.V., Kerby, R.L., Roberts, G.P., and Poulos, T.L. (2000) Structure of the CO sensing transcription activator CooA. *Nat Struct Biol* **7**: 876-880.

- Larsson, J.T., Rogstam, A., and von Wachenfeldt, C.** (2005) Coordinated patterns of cytochrome bd and lactate dehydrogenase expression in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **151**: 3323-3335.
- Layer, G., Verfurth, K., Mahlitz, E., and Jahn, D.** (2002) Oxygen-independent coproporphyrinogen-III oxidase HemN from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**: 34136-34142.
- Layer, G., Grage, K., Teschner, T., Schunemann, V., Breckau, D., Masoumi, A., Jahn, M., Heathcote, P., Trautwein, A.X., and Jahn, D.** (2005) Radical S-Adenosylmethionine Enzyme Coproporphyrinogen III Oxidase HemN: Functional features of the [4Fe-4S] cluster and the two bound S-Adenosyl-L-methionine. *J Biol Chem* **280**: 29038-29046.
- Lazazzera, B.A., Beinert, H., Khoroshilova, N., Kennedy, M.C., and Kiley, P.J.** (1996) DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR protein from *Escherichia coli* are regulated by oxygen. *J Biol Chem* **271**: 2762-2768.
- Leduc, J., Thorsteinsson, M.V., Gaal, T., and Roberts, G.P.** (2001) Mapping CooA. RNA polymerase interactions. Identification of activating regions 2 and 3 in CooA, the co-sensing transcriptional activator. *J Biol Chem* **276**: 39968-39973.
- Lonetto, M.A., Rhodius, V., Lamberg, K., Kiley, P., Busby, S., and Gross, C.** (1998) Identification of a contact site for different transcription activators in region 4 of the *Escherichia coli* RNA polymerase sigma70 subunit. *J Mol Biol* **284**: 1353-1365.
- Lovenberg, W., Buchanan, B.B., and Rabinowitz, J.C.** (1963) Studies on the Chemical Nature of Clostridial Ferredoxin. *J Biol Chem* **238**: 3899-3913.
- Lüders, S.** (2006) Mutationsanalyse des Redoxregulators Fnr aus *Bacillus stearothermophilus*. In *Institut für Mikrobiologie*. Vol. Diplomarbeit Braunschweig: Technische Universität Braunschweig.
- Marino, M., Ramos, H.C., Hoffmann, T., Glaser, P., and Jahn, D.** (2001) Modulation of anaerobic energy metabolism of *Bacillus subtilis* by arfM (ywiD). *J Bacteriol* **183**: 6815-6821.
- Marinoni, I., Nonnis, S., Monteferrante, C., Heathcote, P., Hartig, E., Bottger, L.H., Trautwein, A.X., Negri, A., Albertini, A.M., and Tedeschi, G.** (2008) Characterization of L-aspartate oxidase and quinolinate synthase from *Bacillus subtilis*. *Febs J* **275**: 5090-5107.
- Martin-Verstraete, I., Debarbouille, M., Klier, A., and Rapoport, G.** (1994) Interactions of wild-type and truncated LevR of *Bacillus subtilis* with the upstream activating sequence of the levanase operon. *J Mol Biol* **241**: 178-192.

- Martins, B.M., Dobbek, H., Cinkaya, I., Buckel, W., and Messerschmidt, A.** (2004) Crystal structure of 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase: radical catalysis involving a [4Fe-4S] cluster and flavin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 15645-15649.
- Matzanke, B.F., Muller, G.I., Bill, E., and Trautwein, A.X.** (1989) Iron metabolism of *Escherichia coli* studied by Mossbauer spectroscopy and biochemical methods. *Eur J Biochem* **183**: 371-379.
- McGhee, J.D., and von Hippel, P.H.** (1975a) Formaldehyde as a probe of DNA structure. I. Reaction with exocyclic amino groups of DNA bases. *Biochemistry* **14**: 1281-1296.
- McGhee, J.D., and von Hippel, P.H.** (1975b) Formaldehyde as a probe of DNA structure. II. Reaction with endocyclic imino groups of DNA bases. *Biochemistry* **14**: 1297-1303.
- McKay, D.B., and Steitz, T.A.** (1981) Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 Å resolution suggests binding to left-handed B-DNA. *Nature* **290**: 744-749.
- Miller, J.H.** (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mitchell, P.** (1975) Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c<sub>1</sub> complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle. *FEBS Lett* **56**: 1-6.
- Moore, C.M., Nakano, M.M., Wang, T., Ye, R.W., and Helmann, J.D.** (2004) Response of *Bacillus subtilis* to nitric oxide and the nitrosating agent sodium nitroprusside. *J Bacteriol* **186**: 4655-4664.
- Moore, L.J., and Kiley, P.J.** (2001) Characterization of the dimerization domain in the FNR transcription factor. *J Biol Chem* **276**: 45744-45750.
- Moszer, I., Glaser, P., and Danchin, A.** (1995) SubtiList: a relational database for the *Bacillus subtilis* genome. *Microbiology* **141** ( Pt 2): 261-268.
- Nakano, M.M., Zuber, P., Glaser, P., Danchin, A., and Hulett, F.M.** (1996) Two-component regulatory proteins ResD-ResE are required for transcriptional activation of *fnr* upon oxygen limitation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**: 3796-3802.
- Nakano, M.M., Dailly, Y.P., Zuber, P., and Clark, D.P.** (1997) Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. *J Bacteriol* **179**: 6749-6755.
- Nakano, M.M., and Hulett, F.M.** (1997) Adaptation of *Bacillus subtilis* to oxygen limitation. *FEMS Microbiol Lett* **157**: 1-7.



- Nakano, M.M., Hoffmann, T., Zhu, Y., and Jahn, D.** (1998) Nitrogen and oxygen regulation of *Bacillus subtilis* nasDEF encoding NADH-dependent nitrite reductase by TnrA and ResDE. *J Bacteriol* **180**: 5344-5350.
- Nakano, M.M., and Zuber, P.** (1998) Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Annu Rev Microbiol* **52**: 165-190.
- Nakano, M.M.** (2002) Induction of ResDE-dependent gene expression in *Bacillus subtilis* in response to nitric oxide and nitrosative stress. *J Bacteriol* **184**: 1783-1787.
- Niu, W., Kim, Y., Tau, G., Heyduk, T., and Ebright, R.H.** (1996) Transcription activation at class II CAP-dependent promoters: two interactions between CAP and RNA polymerase. *Cell* **87**: 1123-1134.
- Ollagnier-de Choudens, S., Loiseau, L., Sanakis, Y., Barras, F., and Fontecave, M.** (2005) Quinolinate synthetase, an iron-sulfur enzyme in NAD biosynthesis. *FEBS Lett* **579**: 3737-3743.
- Orlando, V., Strutt, H., and Paro, R.** (1997) Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods* **11**: 205-214.
- Parkinson, G., Gunasekera, A., Vojtechovsky, J., Zhang, X., Kunkel, T.A., Berman, H., and Ebright, R.H.** (1996) Aromatic hydrogen bond in sequence-specific protein DNA recognition. *Nat Struct Biol* **3**: 837-841.
- Popescu, C.V., Bates, D.M., Beinert, H., Munck, E., and Kiley, P.J.** (1998) Mossbauer spectroscopy as a tool for the study of activation/inactivation of the transcription regulator FNR in whole cells of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13431-13435.
- Priest, F.G.** (1993) Systematics and ecology of *Bacillus*. In *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics*. Sonnenshein, A.L., Hoch, J.A. and Losick, R. (eds). Washington, D. C.: American Society for Microbiology, pp. 3-16.
- Qi, Y., and Hulett, F.M.** (1998) PhoP-P and RNA polymerase sigmaA holoenzyme are sufficient for transcription of Pho regulon promoters in *Bacillus subtilis*: PhoP-P activator sites within the coding region stimulate transcription in vitro. *Mol Microbiol* **28**: 1187-1197.
- Raulfs, E.C., O'Carroll, I.P., Dos Santos, P.C., Unciuleac, M.C., and Dean, D.R.** (2008) In vivo iron-sulfur cluster formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 8591-8596.
- Reents, D., Heike** (2005) Charakterisierung des Fnr-Regulationsmechanismus in *Bacillus subtilis*. In *Institut für Mikrobiologie*. Vol. Dissertation Braunschweig: TU-Braunschweig.

- Reents Dissertation, H.** (2005) Charakterisierung des Fnr-Regulationsmechanismus in *Bacillus subtilis*. In *Institut für Mikrobiologie*. Vol. Dissertation Braunschweig: TU-Braunschweig.
- Reents, H., Gruner, I., Harmening, U., Bottger, L.H., Layer, G., Heathcote, P., Trautwein, A.X., Jahn, D., and Hartig, E.** (2006a) *Bacillus subtilis* Fnr senses oxygen via a [4Fe-4S] cluster coordinated by three cysteine residues without change in the oligomeric state. *Mol Microbiol* **60**: 1432-1445.
- Reents, H., Munch, R., Dammeyer, T., Jahn, D., and Hartig, E.** (2006b) The Fnr regulon of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**: 1103-1112.
- Renna, M.C., Najimudin, N., Winik, L.R., and Zahler, S.A.** (1993) Regulation of the *Bacillus subtilis* *alsS*, *alsD*, and *alsR* genes involved in post-exponential-phase production of acetoin. *J Bacteriol* **175**: 3863-3875.
- Rhodius, V.A., and Busby, S.J.** (2000a) Interactions between activating region 3 of the *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein and region 4 of the RNA polymerase sigma(70) subunit: application of suppression genetics. *J Mol Biol* **299**: 311-324.
- Rhodius, V.A., and Busby, S.J.** (2000b) Transcription activation by the *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein: determinants within activating region 3. *J Mol Biol* **299**: 295-310.
- Riedel, P.D.E.** (2004) *Anorganische Chemie*: De Gruyter.
- Ripio, M.T., Dominguez-Bernal, G., Lara, M., Suarez, M., and Vazquez-Boland, J.A.** (1997) A Gly145Ser substitution in the transcriptional activator PrfA causes constitutive overexpression of virulence factors in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **179**: 1533-1540.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Schultz, S.C., Shields, G.C., and Steitz, T.A.** (1991) Crystal structure of a CAP-DNA complex: the DNA is bent by 90 degrees. *Science* **253**: 1001-1007.
- Schünemann, V., and Winkler, H.** (2000a) Structure and dynamics of biomolecules studied by Mössbauer spectroscopy. *Rep Prog Phys* **63**: 263-353.

- Schünemann, V., and Winkler, H.** (2000b) Structure and dynamics of biomolecules studied by Mössbauer spectroscopy. *Reports on Progress in Physics*: 263.
- Sharma, H., Yu, S., Kong, J., Wang, J., and Steitz, T.A.** (2009) Structure of apo-CAP reveals that large conformational changes are necessary for DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 16604-16609.
- Sharrocks, A.D., Green, J., and Guest, J.R.** (1990) In vivo and in vitro mutants of FNR the anaerobic transcriptional regulator of *E. coli*. *FEBS Lett* **270**: 119-122.
- Spiro, S., and Guest, J.R.** (1990) FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* **6**: 399-428.
- Steinmann, R.** (2007) DNA-Bindungsstudien mit dem anaeroben Regulator Fnr aus *Bacillus subtilis*. Vol. Bachelor Braunschweig: Technische Universität Braunschweig.
- Sun, G., Birkey, S.M., and Hulett, F.M.** (1996a) Three two-component signal-transduction systems interact for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**: 941-948.
- Sun, G., Sharkova, E., Chesnut, R., Birkey, S., Duggan, M.F., Sorokin, A., Pujic, P., Ehrlich, S.D., and Hulett, F.M.** (1996b) Regulators of aerobic and anaerobic respiration in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**: 1374-1385.
- Sutton, V.R., Mettert, E.L., Beinert, H., and Kiley, P.J.** (2004) Kinetic analysis of the oxidative conversion of the  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  cluster of FNR to a  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$  Cluster. *J Bacteriol* **186**: 8018-8025.
- Tse Sum Bui, B., Benda, R., Schunemann, V., Florentin, D., Trautwein, A.X., and Marquet, A.** (2003) Fate of the  $(2\text{Fe-2S})(2+)$  cluster of *Escherichia coli* biotin synthase during reaction: a Mossbauer characterization. *Biochemistry* **42**: 8791-8798.
- Volbeda, A., and Fontecilla-Camps, J.C.** (2005) Structural bases for the catalytic mechanism of Ni-containing carbon monoxide dehydrogenases. *Dalton Trans*: 3443-3450.
- Wang, E., Bauer, M.C., Rogstam, A., Linse, S., Logan, D.T., and von Wachenfeldt, C.** (2008) Structure and functional properties of the *Bacillus subtilis* transcriptional repressor Rex. *Mol Microbiol* **69**: 466-478.
- Werst, M.M., Kennedy, M.C., Houseman, A.L., Beinert, H., and Hoffman, B.M.** (1990) Characterization of the  $[4\text{Fe-4S}]^+$  cluster at the active site of aconitase by  $^{57}\text{Fe}$ ,  $^{33}\text{S}$ , and  $^{14}\text{N}$  electron nuclear double resonance spectroscopy. *Biochemistry* **29**: 10533-10540.

- West, D., Williams, R., Rhodius, V., Bell, A., Sharma, N., Zou, C., Fujita, N., Ishihama, A., and Busby, S.** (1993) Interactions between the *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein and RNA polymerase at class II promoters. *Mol Microbiol* **10**: 789-797.
- Williams, R., Bell, A., Sims, G., and Busby, S.** (1991) The role of two surface exposed loops in transcription activation by the *Escherichia coli* CRP and FNR proteins. *Nucleic Acids Res* **19**: 6705-6712.
- Williams, R.M., Rhodius, V.A., Bell, A.I., Kolb, A., and Busby, S.J.** (1996) Orientation of functional activating regions in the *Escherichia coli* CRP protein during transcription activation at class II promoters. *Nucleic Acids Res* **24**: 1112-1118.
- Williams, S.M., Savery, N.J., Busby, S.J., and Wing, H.J.** (1997) Transcription activation at class I FNR-dependent promoters: identification of the activating surface of FNR and the corresponding contact site in the C-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit. *Nucleic Acids Res* **25**: 4028-4034.
- Wing, H.J., Green, J., Guest, J.R., and Busby, S.J.** (2000) Role of activating region 1 of *Escherichia coli* FNR protein in transcription activation at class II promoters. *J Biol Chem* **275**: 29061-29065.
- Yang, J., Bitoun, J.P., and Ding, H.** (2006) Interplay of IscA and IscU in biogenesis of iron-sulfur clusters. *J Biol Chem* **281**: 27956-27963.
- Zhang, X., and Hulett, F.M.** (2000) ResD signal transduction regulator of aerobic respiration in *Bacillus subtilis*: ctaA promoter regulation. *Mol Microbiol* **37**: 1208-1219.
- Zhou, Y., Merkel, T.J., and Ebright, R.H.** (1994a) Characterization of the activating region of *Escherichia coli* catabolite gene activator protein (CAP). II. Role at Class I and class II CAP-dependent promoters. *J Mol Biol* **243**: 603-610.
- Zhou, Y., Pendergrast, P.S., Bell, A., Williams, R., Busby, S., and Ebright, R.H.** (1994b) The functional subunit of a dimeric transcription activator protein depends on promoter architecture. *Embo J* **13**: 4549-4557.

## 8. Anhang

### *Gensequenz des G. stearothermophilus Fnr 1312:*

ATGGAGGTGCTATCGATGGAAGCTGCAGTGAATGGATATTTTCCCCATTACGTTCTTT  
GTTGCAATCGTCGAAAAAAGTGATTCCACTTCGCAAGCACTCCTTTTTGTTCCAAGAAG  
GGATGCCGGCCAATGAATTGTATTTGATCCTCTCTGGCAAAGTGCAAGTGAGCAAAATT  
TGTCCGGACGGAAAAGAAATGTGCTTCCGCATTTGCGGAAGCGGGGAAATCGTTGGTGA  
ATTGACGCTGTTTACGAACGATGCACGCTACTTGTGACGGCCAAGGTAATAGAGCCAG  
GCGAAGCGGCAGTCATAACAAAGAGGAAGTGAACAGCAGCTGCTGATCAATCCGCCC  
CTTACCCTTGAATATATGCGCTGGATCAGCAAGCATGTCCGGCGGACGCAGACGAAATT  
CCGCGATTTGATTATGAACGGAAAAAAGGTGCGTTGTATTCTACGCTCATTCGCCTTT  
GCAACAGTTATGGCGTCTCGCTTGAGGATGGAAGCATTTTGATCGACGTCGCATTGAAA  
AACCAAGACTTAGCCAACTTTTGCGGCACGACGCGCGAAAGCGTCAATCGGATGCTCAA  
CGCCTTGAAACAGGAAGGGATCATCTCGATGGGGCGGGGAAAATTACGGTTTCATGATT  
TAAACTATTTGAAAGCGGAAATCCAATGTGAAGATTGCCCGCCGGATATTTGCTGCATT  
GAGTGAC

### *Proteinsequenz des G. stearothermophilus Fnr 1312:*

MEVLSMEAAVNGYFPHLRSLQSSKKVIPLRKHSFLFQEGMPANELYLILSGKVQVSKI  
CPDGKEMCFRICSGEIVGELTLFTNDARYLLTAKVIEPGEAAVINKEELEQQLLINPP  
LTLEYMRWISKHVRRTQTKFRDLIMNGKKGALYSTLIRLCNSYGVSLDGSILIDVALK  
NQDLANFCGTTRESVNRMLNALKQEGIIISMGRGKITVHDLNYLKAIEIQCEDCPPDICCI  
E

### *Gensequenz des G. stearothermophilus Fnr 2045:*

ATGAACGAGATTGAATCTCGTGAATGGCAGAAGTGGCTTACACCGCTTGGGCGCGATCT  
TCGCCTTGAGAAGGGAACGTACTTGTTCAGAAGGGGAAAAAGCAGAGGATATTTACT  
ATATCCAATCGGGGAAAATCCAAATCAGCAAAATGGACATGGACGGACAGGAGCTCGCG  
CTGCGCATTTGCAGCGAGGGCGATTTGATCGGCGAGCTGACACTGTTTTGCCCTGGCGC  
CCGCTACATGCTGACGGCGAAAGTGCTGGAAGACGGCGTCGTTTCCGCCATTAAGCGCG  
AGACGCTCGAACAAGAACTTGCCAACAATCCGACGCTGGCGATCGAGTTGATGAAATGG  
ATGAGCCTCCATTTCCGCAAAACGCAGACGAAATTCGCGGACTTGATTTTACACGGCAA  
AAAAGGAGCGCTCTATTCAACGCTCATCCGTTTGTGCAACAGCTACGGCGTCATGAAAG  
AAGACGGCATTTTGATCGACGTGCCGCTGACGAACCAAGAGCTCGCCAACCTTTTGCGGC  
ACCTCCCGTGAAGTCGTCAACCGCATGCTCGGCGATTTGCGGAAAAAAGGCGTCATCTC  
CGTGCAAAAAGGAAAAATTCGCGTCCACAACCTTGCAATATTTGCGTGACGAAATCGCCT  
GCGAAGGCTGCCC GCCGAGCTGTGCCGCATTGACTGA

### *Proteinsequenz des G. stearothermophilus Fnr 2045:*

MNEIESREWQKWLTPLRDLRLEKGTLYLFQEGEKAEDIYYIQSGKIQISKMDMDGQELA  
LRICSEGLIGELTLFCPGARYMLTAKVLEDGVVSAIKRETLEQELANNPTLAIELMKW  
MSLHFRKTQTKFRDLILHGKKGALYSTLIRLCNSYGVMKEDGILIDVPLTNQELANFCG  
TSREVVNRMLGDLRKKGVISVQKGKIRVHNLQYLRDEIACEGCPPELCRID

## 9. Danksagung

Ohne die Hilfe und Unterstützung vieler Leute wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen, an dieser Stelle möchte ich diesen Menschen Danke sagen:

Meinem Mentor Prof. Dr. Dieter Jahn, für die Möglichkeit meine Dissertation anzufertigen, die hervorragende Betreuung, die hilfreichen und aufmunternden Diskussionen und Anregungen und die tolle Arbeitsatmosphäre.

Dr. Gunhild Layer für die Übernahme des Korreferats und für die hilfreichen Diskussionen bei vielen Fragestellungen.

Prof. Dr. Ralf R. Mendel für die freundliche Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ganz besonders auch Dr. Elisabeth Härtig, für die hervorragende Betreuung, die Unterstützung bei allen möglichen Ideen, für die Hilfestellung und Anregung während der gesamten Arbeit. Und auch für die besonders leckeren Käsespätzle.

Dr. Heike Brüser, für die Einarbeitung in das Thema während meiner Diplomarbeit.

Anja Hartmann für das Beibringen und die Hilfe bei vielen Methoden während der Arbeit.

Prof. Dr. Trautwein und Dr. Lars Böttger von der Universität Lübeck, für die Messung der Mößbauerspektren.

Claudia Frädrich, für ihre begeisterte Mitarbeit im Rahmen ihrer Bachelorarbeit und ihres Mitarbeiterpraktikums,

Dr. Rebekka Biedendieck für die nächtelangen Korrekturen, die „Deadlines“ während des Schreibens, für das Auto nach der Party heimfahren und das einfach Rebi sein.

Dem ganzen S2 Labor!!

Anika March für einfach alles, dass du die letzten 10 Jahre immer für mich da warst, egal um welche Uhrzeit!! Und so weit ist es nicht!!! Ich werde dich vermissen!

Meinen liebsten Labormädels und Jungs: Tanja Piekarski (Danke für die Korrekturen!!!!), Claudia Schulz, Dr. Petra Tielen, Melanie Burghartz, Dr. Nina Diekmann, Dr. Sabrina Thoma, Sebastian Laaß, Simon Stammen und Isam Haddad. Für die unvergessliche Zeit.

Meinen Freunden: Jessica Salgmann, Christian Schramm, Verena Thiel und Jens Fuhlendorff für die vielen schönen Stunden, Abende, Wochen, Monate und Jahre!

Ganz besonders möchte ich mich bedanken bei meiner Familie, der ich diese Arbeit widme, dafür dass ihr immer für mich da seid, mich immer unterstützt und immer an mich glaubt!

